

SÉRIE A, N° 1764

N° D'ORDRE :
2630

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES
(DOCTORAT D'ÉTAT)

PAR

Shokon KAKOU

(郭 松 根)

Docteur en Médecine.

1^{re} THÈSE : — ETUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DE LA FLUORESCENCE
DES SÉRUMS

2^e THÈSE : — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.
INTERFÉROMÉTRIE. APPLICATION A LA MESURE DES
LONGUEURS D'ONDES.

Soutenues le 4 Décembre 1937, devant la Commission d'examen.

Président : M. Ch. FABRY, Professeur.

Examineurs : M. L. DUNOYER, Professeur.

M. H. CHRÉTIEN, Professeur.

*Ouvrage publié sous les auspices de l'Institut d'Etudes Japonaises
de l'Université de Paris (Fondation Mitsui) et du Comité de
Patronage des Etudiants Japonais en France.*

PARIS
LIBRAIRIE LIPSCHUTZ
4, PLACE DE L'ODÉON

1937

**ETUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE
DE LA FLUORESCENCE DES SÉRUMS**

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire M. MOLLIARD.

Doyen C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du globe.

<i>Professeurs honoraire</i> ...	H. LEBESGUE.	BLAISE.	G. BERTRAND.
	A. FERNBACH.	DANGEARD.	ABRAHAM.
	Emile PICARD.	LESPIEAU.	Ch. FABRY.
	Léon BEILLOUIN.	MARCHIS.	Léon BERTRAND.
	GUILLET.	VESSIOT.	WINTREBERT.
	PÉCHARD.	PORTIER.	DUBOSCQ.
	FREUNDLER.	MOLLIARD.	BOHN.
	AUGER.	LAPICQUE.	

PROFESSEURS

M. CAULLERY	T	Zoologie (Evolution des êtres organisés)	H. BÉGHIN	T	Mécanique physique et expérimentale.
G. URBAIN	T	Chimie générale.	FOCH		Mécanique expérimentale des fluides.
Emile BOREL	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.	PAUTHENIER		Physique (P. C. B.).
Jean PERRIN	T	Chimie physique.	De BROGLIE	T	Théories physiques.
E. CARTAN	T	Géométrie supérieure.	CHRÉTIEN		Optique appliquée.
A. COTTON	T	Recherches physiques.	P. JOB		Chimie générale.
J. DRACH	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	LABROUSTE		Physique du Globe.
Charles PÉREZ ...	T	Zoologie.	PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées.
E. RABAUD	T	Biologie expérimentale	VILLEY		Mécanique physique et expérimentale.
M. GUICHARD		Chimie minérale.	COMBES	T	Physiologie végétale.
Paul MONTEL	T	Théorie des fonctions et Théorie des transformations.	GARNIER	T	Mathématiques générales.
L. BLARINGHEM ..	T	Botanique.	PÈRES		Mécanique théorique des fluides.
G. JULIA	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.	HACKSPILL		Chimie (P. C. B.).
G. MAUGUIN	T	Minéralogie.	LAUGIER	T	Physiologie générale.
A. MICHEL-LÉVY ..	T	Pétrographie.	TOUSSAINT		Technique Aéronautique.
H. BÉNAUD	T	Mécanique expérimentale des fluides.	M. CURIE		Physique (P. C. B.).
A. DENJOY	T	Application de l'analyse à la Géométrie.	G. RIBAUD	T	Hautes températures.
L. LUTAUD	T	Géographie physique et géologie dynamique.	CHAZY	T	Mécanique rationnelle.
Eugène BLOCH ...	T	Physique	GAULT		Chimie (P. C. B.).
G. BRUHAT		Physique.	CROZE		Recherches Physiques.
E. DARMOIS	T	Enseignement de Physique.	DUPONT	T	Théories chimiques.
A. DEBIERNE	T	Physique Générale et Radioactivité.	LANQUINE	T	Géologie structurale et géologie appliquée.
A. DUFOUR	T	Physique (P. C. B.).	VALIRON		Mathématiques générales.
L. DUNOYER		Optique appliquée.	BARRABÉ		Géologie structurale et géologie appliquée.
A. GUILLIERMOND.	T	Botanique.	MILLOT		Biologie animale (P. C. B.).
M. JAVILLIER	T	Chimie biologique.	F. PERRIN		Théorie physique.
L. JOLEAUD		Paléontologie.	VAVON		Chimie organique.
ROBERT-LÉVY	T	Physiologie comparée.	G. DARMOIS		Calcul des probabilités et Physique-Mathématique.
F. PICARD		Zoologie (Evolution des êtres organisés).	CHATTON	T	Biologie maritime.
Henri VILLAT ...	T	Mécanique des fluides et applications.	AUBEL		Chimie biologique.
Ch. JACOB	T	Géologie.	Jacques BOURCART.		Géographie physique et Géologie dynamique.
P. PASCAL	T	Chimie minérale.	M ^{me} JOLIOU-CURIE		Physique générale et Radioactivité.
M. FRÉCHET	T	Calcul différentiel et Calcul intégral.	PLANTFOL		Biologie végétale (P. C. B.).
E. ESOLANGON ..	T	Astronomie.	CABANNES		Enseignement de Physique.
M ^{me} RAMART-LUCAS	T	Chimie organique.	GRASSE		Biologie animale (P. C. B.).
			PREVOST		Chimie (P. C. B.).

Secrétaire A. PACAUD.

Secrétaire honoraire D. TOMBECK.

SÉRIE A, N° 1764

N° D'ORDRE :
2630

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES
(DOCTORAT D'ÉTAT)

PAR

Shokon KAKOU

(郭 松 根)

Docteur en Médecine.

1^{re} THÈSE : — ÉTUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DE LA FLUORESCENCE
DES SÉRUMS

2^e THÈSE : — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.
INTERFÉROMÉTRIE. APPLICATION A LA MESURE DES
LONGUEURS D'ONDES.

Soutenues le 4 Décembre 1937, devant la Commission d'examen.

Président : M. Ch. FABRY, Professeur.

*Examineurs : M. L. DUNOYER, Professeur.
M. H. CHRÉTIEN, Professeur.*

*Ouvrage publié sous les auspices de l'Institut d'Etudes Japonaises
de l'Université de Paris (Fondation Mitsui) et du Comité de
Patronage des Etudiants Japonais en France.*

PARIS
LIBRAIRIE LIPSCHUTZ
4, PLACE DE L'ODÉON

1937



A MONSIEUR CHARLES FABRY

Membre de l'Académie des Sciences.

Professeur à l'Université de Paris et à l'Ecole Polytechnique.

Directeur Général de l'Institut d'Optique Théorique et Appliquée.

*Hommage respectueux et profonde
reconnaissance.*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INTRODUCTION

Lorsqu'une substance absorbe certaines radiations, la somme de l'énergie transmise et de l'énergie réfléchie est égale à la fraction non absorbée de l'énergie incidente; la fraction absorbée se transforme alors en une autre forme d'énergie, le plus souvent en énergie calorifique : les radiations absorbées servent à élever la température de la substance.

Il n'en est pas toujours de même avec certaines substances qui possèdent la propriété spéciale d'émettre une lumière plus ou moins intense de colorations variées, quand elles sont exposées à une source de rayonnement visible ou invisible, sans qu'il en résulte une élévation appréciable de la température : les radiations absorbées sont ainsi susceptibles de produire la luminescence. La longueur d'onde des radiations émises est différente de celle des radiations excitatrices. Ce phénomène est appelé photoluminescence, lorsque la luminescence est excitée par les radiations lumineuses. Une luminescence analogue, que l'on désigne sous le nom de radioluminescence, peut être produite également par les rayons X, les rayons cathodiques ou les rayonnements émis par un corps radioactif.

Dans le cas de la photoluminescence, on distingue ordinairement deux modes différents d'émission : la fluorescence et la phosphorescence, suivant la durée de l'émission lumineuse après suppression des radiations excitatrices.

L'émission de la fluorescence cesse dès que l'on supprime l'excitation qui la produit, alors que l'émission de la phosphorescence persiste plus ou moins longtemps après la suppression des radiations excitatrices. La fluorescence est la propriété d'un certain nombre de corps solides, liquides ou gazeux, tandis que la phosphorescence est l'apanage presque exclusif des solides.

Toutefois, l'étude moderne de ces phénomènes a montré que la fluorescence n'est pas un phénomène absolument instantané, et qu'elle subsiste pendant un temps mesurable, bien que très court, après la suppression du rayonnement excitateur (1), (2)¹; il est donc impossible aujourd'hui de définir ces deux phénomènes uniquement d'après leur durée.

Cependant, il existe heureusement un phénomène caractéristique de la phosphorescence : on a constaté que la durée de la phosphorescence dépend des conditions extérieures. Si l'on élève la température, l'émission de la phosphorescence diminue rapidement, tandis que la durée d'émission augmente lorsque l'on abaisse la température. Au contraire, la durée d'émission des fluorescences usuelles est pratiquement indépendante des conditions extérieures (3).

(1) Les chiffres entre parenthèses dans le texte renvoient à la bibliographie située à la fin de l'ouvrage.

STOCKES a énoncé une loi, suivant laquelle, dans tous les phénomènes de fluorescence ou de phosphorescence, les radiations excitatrices se transforment toujours en radiations de plus grande longueur d'onde. Mais de nombreuses recherches ont montré que la loi de Stokes n'est pas toujours absolue, les bandes des spectres d'excitation et d'émission se chevauchant parfois.

On a constaté que, suivant la radiation excitatrice, la fluorescence varie. D'autre part, cette fluorescence peut se produire aussi dans la région infrarouge ou ultraviolette.

A la suite de la découverte de la théorie des quanta, on a aujourd'hui la conception suivante de l'origine des phénomènes de luminescence : Lorsque la molécule d'une substance est excitée par une radiation donnée, des électrons sont portés d'un certain niveau d'énergie à un autre plus élevé. Les électrons ainsi excités tombent ensuite sur un niveau d'énergie inférieur au deuxième et supérieur ou égal au premier, ce qui produit une émission d'énergie; la fréquence de cette énergie émise peut être égale à celle de la radiation absorbée (résonance optique), ou bien plus généralement différente (photoluminescence).

La théorie de la double tautomérisation symétrique de HEWITT (1900) (4) expliquant l'origine de la fluorescence, était basée sur l'hypothèse que l'énergie était absorbée, la molécule ayant une certaine configuration, puis émise avec une fréquence plus petite.

lorsque la molécule avait acquis une autre configuration. Les niveaux d'énergie au sens électronique du mot n'étaient pas connus à cette époque.

Nombreux sont les corps fluorescents : les solutions d'esculine, de fluorescéine, de sulfate de quinine, les sels d'urane, la chlorophylle, les divers composés de l'acridine, etc.

La fluorescence des solides, liquides et vapeurs a fait l'objet de nombreuses recherches de physique pure; on pourra trouver la documentation relative à ce sujet dans des traités spéciaux (5), (6). L'examen de la fluorescence est appliquée de plus en plus dans tous les domaines de la recherche scientifique.

C'est avec l'emploi du filtre de Wood à l'oxyde de nickel (7) que l'on a fait, au cours de ces dernières années, plusieurs applications de la fluorescence aux recherches médicales et biologiques. Quand on utilise une lampe à vapeur de mercure comme source lumineuse, cet écran de Wood qui absorbe presque entièrement les radiations visibles, laisse passer surtout la radiation 3650 Å. Dans le domaine médical, presque toutes les observations faites sur la fluorescence ont été effectuées à l'œil nu, sans que l'on ait étudié le spectre de la fluorescence. En biologie, de nombreux travaux sur les spectres de fluorescence ont été publiés par divers auteurs, surtout par Ch. DHÉRE et ses élèves (8), (9), (10) qui avaient étudié d'une façon détaillée le spectre des fluorescences émises par des pigments animaux ou végétaux : chlorophylles, porphyrines, urobilines, etc.

La plupart des travaux ne traitent pas, cependant, de la répartition de l'énergie dans le spectre de fluorescence; les auteurs qui ont photographié des spectres de fluorescence pour en observer les bandes, ne semblent pas avoir tenu compte de la variation de la sensibilité des plaques utilisées avec la longueur d'onde.

Dans une de mes publications antérieures (11), j'ai montré l'intérêt de la mesure spectrophotométrique pour la détermination des couleurs. Il est intéressant d'appliquer cette même méthode spectrophotométrique à l'observation des couleurs constitutives de la fluorescence, étude que l'on entreprend en biologie et en médecine; l'examen spectroscopique ou spectrographique est seulement qualitatif, tandis que l'examen par la spectrophotométrie est à la fois quantitatif et qualitatif.

Le problème de la fluorescence des sérums n'a pas attiré l'attention des chercheurs autant que celui de la fluorescence des autres produits biologiques. Les quelques documents qui existent sur ce sujet, traitent d'observations presque toutes faites à l'œil nu, sans considération spectroscopique de la fluorescence (voir Chapitre Premier). Il m'a paru fort intéressant d'étudier la fluorescence des sérums de l'Homme et des animaux normaux ou pathologiques à l'aide de la méthode spectrophotométrique, car, en traçant la courbe de la répartition d'énergie en fonction de la longueur d'onde, on peut arriver non seulement à évaluer l'intensité totale de la fluorescence, mais encore à établir

différents types de courbes suivant l'espèce et la provenance des sérums. Les résultats ainsi obtenus pourront contribuer tant à la différenciation des divers sérums qu'au diagnostic des maladies produisant un changement de l'état colloïdal si complexe du sérum.

En effet, la fluorescence des sérums est généralement trop faible, pour que l'on puisse la mesurer spectrophotométriquement avec précision. En utilisant un spectrophotémètre de grande luminosité et une source lumineuse excitatrice de grande puissance, j'ai pu poursuivre mes recherches d'une façon satisfaisante. J'ai tout d'abord étudié la fluorescence émise par différents sérums (Homme et animaux normaux), étude qui m'a permis d'obtenir des résultats intéressants. Ces résultats pourront servir de base à des investigations ultérieures sur les maladies modifiant la structure du sérum.

Ces recherches ont été poursuivies aux laboratoires de l'Institut d'Optique Théorique et Appliquée sous la direction de Monsieur le Professeur Charles FABRY. Je suis heureux d'exprimer à Monsieur FABRY, ma profonde gratitude pour son accueil bienveillant, pour les conseils précieux qu'il m'a prodigués au cours de ces recherches, et pour l'intérêt incessant qu'il y a porté. Je tiens à remercier vivement M. A. BAYLE, Ingénieur à l'Institut d'Optique, qui a eu l'amabilité de me prêter son aide si précieuse pour la construction des appareils.

CHAPITRE PREMIER

ETUDE DE LA FLUORESCENCE DES SERUMS

Il est intéressant de remarquer que la plupart des organes et des tissus de l'Homme et des animaux émettent, sous l'influence des rayons ultraviolets, des fluorescences typiques. C'est H. STÜBEL (12) qui a constaté le premier, que divers organes des animaux, exposés aux rayons ultraviolets, présentent des fluorescences de teintes variées. Ultérieurement, E. DERRIEN et J. TURCHINI (13), (14) ont observé la fluorescence de différents tissus sous l'action de radiations ultraviolettes. F. VLÈS et A. UGO (15), ont étudié les relations entre la fluorescence de la peau et celle du cholestérol.

De nombreux auteurs ont remarqué la fluorescence des liquides de l'organisme sous l'influence des rayons ultraviolets. La fluorescence du lait a été observée par H. STÜBEL (12), O. GERNGROSS, M. SCHULZ (16), J. SPORVERINI (17) et R. JOACHIMOVITS (18); et la fluorescence de l'urine par H. W. KINNERSLEY, R. A. PETERS, B. T. SQUIRES (19), (20), A. HADJIOLOFF, T. KRESTEFF (21), Y. YONEYAMA (22), G. HOLLAND, A. SCHÜRMEYER, P. NIEDERHOFF (23), (24), W. F. WASSINK (25),

et K. VON DEM BORNE (26), sans compter les nombreux auteurs qui ont étudié la fluorescence de différents pigments de l'urine et de la bile.

R. HELLER (27), C. SIMONIN (28), M. BORNAND, G. BONIFAZI (29), P. PONTIUS, A. HUSSON (30) ont observé la fluorescence du sperme; G. KÖGEL (31), R. EXNER, E. KLEMPERER (32), P. GYÖRGY, R. KUHN (33), F. PLAUT, K. BOSSERT, M. BÜLOW (34), Ch. J. KELLER, H. SCHOEN (35) se sont occupés de la fluorescence du liquide céphalo-rachidien.

Il n'y a qu'une dizaine d'années, cependant, que l'on a porté attention à la fluorescence du sérum même, chose curieuse si l'on considère l'importance de ce milieu biologique.

1. TRAVAUX ANTÉRIEURS AU SUJET DE LA FLUORESCENCE DES SÉRUMS.

Les documents sur ce sujet sont très peu nombreux (36), (37). Les premiers auteurs qui aient signalé la fluorescence émise par le sérum à la lumière de Wood, sont P. COURMONT, Th. NOGIER (38), M. CHAMPEIL (39), H. W. KINNERSLEY, R. A. PETERS, B. T. SQUIRES (19). G. KÖGEL (31), en 1928, a observé photographiquement la fluorescence de différents échantillons de sérums.

P. WELS (40), (41) a montré que l'euglobuline du sérum, en solution avec Na Cl, et ses produits de dédoublement donnaient une fluorescence bleuâtre qui devenait plus intense par irradiation à l'aide de la lumière totale de la lampe à vapeur de mercure; cette

augmentation de la fluorescence se produisait après que l'on eût pratiqué l'irradiation totale pendant seulement très peu de temps et s'accroissait avec la durée de l'irradiation. Il est vraisemblable, d'après cet auteur, que les modifications de la fluorescence de l'albumine et de ses produits de dédoublement indiquent les processus fondamentaux photochimiques de l'action biologique des rayons, car la fluorescence des corps organiques dépend de leur constitution chimique.

En 1931, S. STERLING-OKUNIEWSKI et Z. PENSKA (42) examinant, à la lumière de Wood, des sérums d'homme et de cheval, sont arrivés à la conclusion suivante : tout sérum transparent, non hémolysé et conservé stérile, donne une fluorescence de couleur bleu-pigeon; les sérums stériles gardent assez longtemps cette couleur sans changement, mais, si le sérum est infecté par les microbes, la couleur de la fluorescence tire sur le vert brunâtre. La couleur de la fluorescence n'est pas influencée par l'exposition des sérums à l'action des rayons de Wood, même après 24 heures d'exposition. Sous le rapport de la fluorescence, les sérums de cheval ne diffèrent pas des sérums humains.

P. F. LENSCHOW (43) a examiné également la fluorescence du sérum du cheval.

Pendant, tous ces auteurs n'ont pas pris en considération le spectre d'émission de la fluorescence qu'ils étudiaient.

C'est O. RECHE (44), (45), (46) qui a effectué les re-

cherches les plus étendues sur la fluorescence des sérums humains excités par la radiation ultraviolette. Il a trouvé que les sérums des individus bien portant ne présentent qu'une fluorescence très faible, tandis que les sérums pathologiques possèdent une fluorescence dont l'intensité est notable et dont les couleurs montrent une grande diversité, particulièrement parmi les tons jaune, vert et bleu. Dans une nouvelle publication (47), cet auteur formule l'hypothèse suivante : La fluorescence est due à la molécule d'albumine ou de globuline et il est probable que ce sont les variations du rapport de l'albumine à la globuline qui causent les changements de la teinte de la fluorescence.

W. BUCHLOH (48) a examiné, au moyen du photomètre à degrés de Pullfrich et du disque coloré d'Ostwald, la coloration normale de la fluorescence des sérums provenant de sujets sains. Il a montré que l'augmentation de graisse dans le sérum produit une variation nette vers le bleu de la teinte de la fluorescence. Il a constaté, comme RECHE, que généralement le sérum normal ne possède qu'une faible fluorescence dans le vert, avec de très minimes variations suivant les individus.

Pour analyser les longueurs d'onde et ainsi avoir une détermination exacte des couleurs, O. RECHE et J. SCHILLING (49) ont photographié des spectres de fluorescence des sérums humains; ils ont prouvé que de petites traces d'hémoglobine peuvent modifier énormément la teinte et l'intensité de la fluorescence

et que, par conséquent, les sérums hémolysés sont inutilisables pour ces recherches. Tous les sérums des individus bien portant, disent-ils, montrent, sous l'influence des rayons ultraviolets, une fluorescence faible dans la teinte vert-grisâtre. Cette teinte est due à la production des rayons jaunes et bleus qui, en se combinant, donnent l'impression du vert. Le spectrogramme présente deux bandes notables, l'une ayant son maximum de clarté vers 550 mμ, l'autre vers 450 mμ. Du reste, ces auteurs ont obtenu le spectre de la fluorescence d'un sérum pathologique, spectre ayant une seule bande, large et brillante, dont le maximum de clarté se trouvait vers la longueur d'onde 430 mμ.

F. VLÈS (50) a constaté dernièrement que les radiations ultraviolettes susceptibles de provoquer de la fluorescence dans le sérum humain total, desséché sur lame, s'étendent de λ 248 au visible, avec maxima à 302-296, 253 et minimum à 270-275 mμ.

2. IMPORTANCE DE LA SPECTROPHOTOMÉTRIE DANS L'ÉTUDE DE LA FLUORESCENCE DES SÉRUMS.

En passant en revue les travaux sur la fluorescence des sérums publiés jusqu'à présent, on constate que les auteurs qui ont photographié des spectrogrammes de fluorescence, ne paraissent pas tenir compte du fait que la sensibilité des plaques photographiques varie suivant la longueur d'onde (51). Il est donc impossible d'évaluer immédiatement l'intensité d'émission de la fluorescence d'après le noircissement de

la plaque, sans recourir à la spectrophotométrie photographique. A plus forte raison, les maxima d'émission dans les bandes ne peuvent pas être estimés par simple observation du spectre sur le cliché, comme l'on fait O. RECHE et J. SCHILLING (49). D'autre part, étant donné que l'œil humain n'a pas la même sensibilité pour chaque longueur d'onde à énergie égale dans le spectre visible (52), (53), (54), (55), il n'est pas correct non plus d'évaluer, au spectroscope, l'intensité des différentes parties du spectre, sans les comparer avec le spectre d'une lumière, dont la répartition d'énergie en fonction de la longueur d'onde est connue.

Dans une de mes publications précédentes (11), j'ai déjà signalé l'importance de la spectrophotométrie pour la détermination et l'identification des couleurs. Bien qu'il existe des couleurs variées dans le phénomène de fluorescence, il est évident que la simple description de la couleur observée à l'œil nu n'offre aucune précision. Dans le spectre visible, la fluorescence occupe, pour la plupart des corps, une grande étendue. Les fluorescences qui semblent à l'œil de même intensité et de même coloration, peuvent montrer, par la spectrophotométrie, des bandes nettement différenciées par la forme, la position et l'intensité : en d'autres termes, deux rayonnements peuvent avoir des courbes spectrales d'énergie très différentes et donner la même impression de couleur. nos sensations colorées étant beaucoup moins variées

que ne le sont les diverses courbes possibles d'énergie.

Pour définir la fluorescence du sérum humain sain au point de vue de la teinte et de l'intensité, W. BUCHLOH (48) a utilisé le photomètre à degrés de Pullfrich, muni d'un disque de couleurs d'Ostwald, méthode qui n'est qu'un procédé combiné de la colorimétrie et la photométrie; la photométrie détermine l'éclat (l'intensité lumineuse totale) et la colorimétrie définit généralement les couleurs par la tonalité (la longueur d'onde dominante) et la saturation (la proportion de lumière blanche mélangée) (56). On n'obtient ainsi qu'une évaluation subjective et approximative de la sensation colorée.

Au point de vue scientifique, la courbe spectrale de la répartition d'énergie obtenue uniquement par la spectrophotométrie, est nécessaire et suffisante pour définir un rayonnement tel que la fluorescence. Par ailleurs, l'aire de la courbe est proportionnelle à l'intensité totale du rayonnement. Si la spectrographie et la spectroscopie sont des examens qualitatifs pour l'étude de la fluorescence, la spectrophotométrie est réellement une méthode quantitative qui permette de réaliser à la fois la colorimétrie et la photométrie d'une façon plus précise.

En outre, on peut classer, à l'aide de la mesure spectrophotométrique, une série de corps fluorescents suivant les types de courbe spectrale d'énergie, et cela quelle que soit la couleur. Il en est de même avec les sérums dont l'espèce et la provenance pour-

raient être identifiées d'après la forme de la courbe spectrale d'énergie fournie par leur fluorescence.

Pour ces raisons, j'ai choisi la méthode spectrophotométrique pour ma présente étude de la fluorescence des sérums.

3. OBJET DE MES RECHERCHES.

En chimie, il y a une dizaine d'années que l'on applique le phénomène de fluorescence à la différenciation de nombreuses substances organiques et anorganiques (57). En biologie, l'étude spectroscopique de la fluorescence facilite grandement, comme l'ont montré Ch. DHÉRE et ses élèves (8), (9), (10), l'identification de divers pigments animaux et végétaux : chlorophylles, porphyrines, urobilines, etc.

Au cours de ces dernières années, la méthode d'observation de la fluorescence a été appliquée à la médecine par plusieurs auteurs. Citons, par exemple, H. BIERRY et B. GOUZON (58) qui, à l'aide de la spectrographie de la fluorescence, ont réussi à caractériser des taches de sang; W. BRUNNER (59) qui a observé la fluorescence de la bilirubine du sérum sanguin, en ajoutant à celui-ci de l'acétate de zinc; H. VAN DEN BERGH, W. GROTEPASS (60), E. VIGLIANI, Cl. ANGELERI (61) qui, en se servant de procédés chimiques, ont tenté de déceler dans le sérum la présence de la porphyrine par observation de sa fluorescence rouge; et enfin Ch. ACHARD, A. BOUTARIC et J. BOUCHARD (62), (63), (64), (65), qui ont étudié particulièrement l'influence du sérum sur le pouvoir fluorescent de l'uranine.

En ce qui concerne la recherche de la fluorescence du sérum sanguin, les documents sont très peu nombreux, comme je l'ai déjà exposé plus haut. D'ailleurs, aucun auteur n'a tenu compte de l'importance de la spectrophotométrie dans une étude de ce genre.

Il m'a paru fort intéressant, tant au point de vue médical qu'au point de vue biologique, d'étudier d'abord, par la spectrophotométrie, la fluorescence de différents sérums normaux de l'Homme et des animaux. Le problème est cependant très difficile, par suite de l'intensité de la fluorescence si faible, qu'il est très difficile d'analyser sa lumière; il a donc exigé la mise au point de dispositifs nouveaux et délicats qui m'ont permis d'obtenir des résultats intéressants.

Les résultats obtenus peuvent servir non seulement à la différenciation des espèces de sérums, mais aussi au diagnostic des sérums normaux et pathologiques, les couleurs et par conséquent les courbes spectrales de fluorescence étant nettement différentes.

On sait que, suivant la radiation excitatrice, le spectre de fluorescence varie et peut s'étendre jusqu'à la région infrarouge ou ultraviolette. Dans mon présent travail, je me suis borné au spectre visible, car c'est la région la plus importante pour la définition des couleurs, les rayons d'une lampe à vapeur de mercure, filtrée par un écran de Wood, ayant été utilisé comme radiation excitatrice ($\lambda = 3650 \text{ \AA}$).

Il est certain que, dans certaines maladies, telles que l'ictère, le diabète, etc., qui produisent dans le

sang des composants anormaux, la fluorescence du sérum est modifiée. J. Th. BRUGSCH (66) a d'ailleurs constaté que le sérum des malades dont l'excrétion hépatique est troublée, présente, sous les rayons ultraviolets, une fluorescence rouge due à la présence de la porphyrine biliaire qui a pénétré dans le sang. Dans le cas des maladies infectieuses, les microbes et leurs produits de métabolisme qui s'accumulent dans le sang, doivent influencer également la fluorescence du sérum. Enfin, chez les individus atteints de maladies chroniques, l'état colloïdal et la constitution du sang étant modifiés, les courbes spectrales de la fluorescence ne peuvent évidemment pas rester inchangées. En conséquence, il paraît possible d'établir une nouvelle méthode physique de diagnostic, basée sur la spectrophotométrie de la fluorescence, méthode qui est beaucoup plus précise que les méthodes d'investigation habituelles. Si, dans certaines maladies, la fluorescence n'est pas assez nette, pour être analysée, on peut avoir recours à des réactifs chimiques appropriés, comme l'a montré W. BRUNNER (59).

Il reste encore beaucoup à faire pour arriver à établir une nouvelle sérologie spectrophotométrique qui permette de réaliser le diagnostic des maladies d'une manière précise et de suivre leur développement sous traitement. Il ne paraît pas impossible de trouver, au moyen de la fluorescence des sérums, un diagnostic précoce des maladies, telles que le cancer, dont le pronostic est fonction de la précocité du diagnostic.

Je suis persuadé que mes résultats serviront de base à des recherches ultérieures; ils apportent également une contribution à la biophysique moléculaire. La technique que j'ai développée dans mon présent travail, peut rendre de grands services en biologie et en médecine aux chercheurs qui ont besoin d'étudier avec précision les phénomènes de luminescence de très faible intensité.

CHAPITRE II

METHODES SPECTROPHOTOMETRIQUES DANS L'ETUDE DU RAYONNEMENT DES SOURCES LUMINEUSES DE FAIBLE INTENSITE

La fluorescence des sérums est une source lumineuse de très faible intensité qu'il s'agit de mesurer spectrophotométriquement. La spectrophotométrie qui a pour but de mesurer l'intensité énergétique d'une source lumineuse en fonction de la longueur d'onde, se ramène à des comparaisons entre l'énergie de rayonnement de la source à examiner et celle d'une autre source de lumière donnant un rayonnement à spectre continu et à courbe spectrale d'énergie connue : les spectres des deux sources lumineuses, obtenus avec un même prisme, sont juxtaposés et établis pour pouvoir superposer les longueurs d'onde correspondantes; on égalise l'éclat des diverses régions du spectre en affaiblissant l'une des sources dans un rapport connu. L'une des sources étant l'étalon lumineux, on détermine entièrement la qualité et la quantité lumineuse de l'autre source par le

moyen d'une courbe dont les coordonnées sont la longueur d'onde et l'intensité¹.

La méthode de mesure par comparaison avec une source à spectre continu de distribution connue, évite la correction due à la variation de dispersion et d'absorption de l'appareil dispersif, car la variation dans les différentes régions du spectre est la même pour les deux spectres qui ont subi le même affaiblissement en traversant le même système dispersif.

1. SOURCES ÉTALONS D'ÉNERGIE.

La source lumineuse idéale pour servir de lumière de comparaison, c'est-à-dire d'étalon, est le corps noir, ou radiateur intégral, dont l'émission spectrale d'énergie à une température déterminée peut être calculée (voir Chapitre III). Puisque la réalisation parfaite du corps noir exige un appareillage assez compliqué (67), on a essayé de trouver, pour la spectrophotométrie dans le visible, des étalons secondaires de distribution spectrale (68), (69), tels que la flamme de l'acétylène, la flamme de Hefner, le cratère positif de l'arc au charbon et les lampes à incandescence : la température de couleur équiva-

(1) Pour déterminer la distribution spectrale d'énergie, on peut avoir recours également aux mesures directes spectroradiométriques que l'on réalise à l'aide d'une pile thermo-électrique, d'un bolomètre ou d'un radiomètre en tenant compte de la dispersion et de l'absorption du spectromètre (W. W. Coblentz. Instruments and methods of radiometry. Journal of the Optical Society of America, Vol. 5, p. 259, 1921); mais la spectroradiométrie n'est pas capable de mesurer une source de lumière aussi faible que la fluorescence.

lente¹ de ces étalons secondaires est déterminée par comparaison avec un corps noir.

Le meilleur étalon secondaire d'énergie que l'on puisse utiliser sans inconvénient pour le spectre visible, est la lampe à filament de tungstène (68); aussi pour mes présentes recherches ai-je employé comme source de comparaison une lampe Philips à incandescence.

Les lampes à incandescence étant étalonnées avec un corps noir, on peut calculer la distribution spectrale d'énergie par leur température de couleur; elles permettent de tracer la courbe d'énergie d'un rayonnement quelconque, par comparaison spectrophotométrique, celle-ci se pratiquant de diverses façons : soit à l'aide d'un couple thermo-électrique ou d'une cellule photo-électrique, soit par la mesure des noircissements d'une plaque photographique ou par la méthode visuelle.

Chaque méthode a ses avantages et ses inconvénients; on considère généralement que les méthodes électriques sont directes et permettent des comparaisons plus faciles. Mais la sensibilité du couple thermo-électrique, et même celle de la cellule photo-électrique, est en général insuffisante pour mesurer spectrophotométriquement une lumière aussi faible que la fluorescence des sérums.

(1) Rappelons que la température de couleur équivalente d'une source lumineuse est la température à laquelle le corps noir émet un rayonnement pratiquement identique, à un facteur constant près, et dans l'étendue du spectre visible, au rayonnement de cette source à une autre température que celle du corps noir.

Les méthodes photographiques et visuelles sont les plus indiquées pour l'étude de rayonnement de la fluorescence de très faible intensité.

2. SPECTROPHOTOMÉTRIE PHOTOGRAPHIQUE.

Bien que l'intensité de la fluorescence des sérums soit extrêmement faible, on peut photographier son spectre au moyen d'un spectrographe de grande luminosité avec un temps de pose prolongé, comme on le fait dans l'étude de l'effet Raman. D'autre part, si l'on choisit les plaques les plus sensibles pour la région du spectre considérée, et si l'on augmente le plus possible l'intensité de la source excitatrice sans risquer de décomposer la matière éclairée, on a plus de facilité pour obtenir des spectrogrammes nettement impressionnés.

En effet, la spectrophotométrie photographique est basée sur l'enregistrement photographique des spectres ayant des densités¹ égales sur un même cliché, avec un temps de pose identique. Le spectre de la fluorescence étant photographié, le problème consiste donc à faire varier les intensités des différentes longueurs d'onde de la source étalon dans des rapports connus.

Pour l'affaiblissement de l'intensité, on peut utiliser un coin neutre photométrique (51), divers prismes de polarisation (NICOL, GLAN, GLAZEBROOK, etc.) (70),

(1) On appelle densité d'une lame absorbante, le logarithme décimal du rapport du flux incident au flux transmis.

des diaphragmes (71), (72), ou différentes grilles (73) (74) (75); on peut aussi varier la distance de la source avec un temps de pose constant ¹ ou bien varier le temps de pose sans changer la distance de la source (51).

Le noircissement de toutes les images correspondant à une longueur d'onde donnée est mesuré, après développement du cliché, à l'aide de microphotomètres de divers types : citons par exemple le microphotomètre FABRY et BUISSON (type visuel) (76) (77), le microphotomètre LAMBERT et CHALONGE (type enregistreur à cellule photo-électrique) (78) et le microphotomètre MOLL (type enregistreur à pile thermo-électrique) (79). Si la densité de l'une des images des spectres d'étalonnage se trouve égale à celle de la même longueur d'onde sur le spectre de la fluorescence, on obtient immédiatement l'intensité de la fluorescence, puisque la source étalon a été affaiblie dans un rapport connu; il est nécessaire, le plus souvent, d'avoir recours à l'interpolation.

Ce qui précède est relatif à la spectrophotométrie photographique, méthode que l'on peut utiliser pour les recherches sur la fluorescence des sérums; toutefois, je n'ai pas employé cette méthode pour ma présente étude, en vue d'éviter l'altération éventuelle du sérum pouvant se produire à la suite d'un temps de pose trop prolongé.

(1) L'intensité du rayonnement varie en raison inverse du carré de la distance de la source au point éclairé.

3. SPECTROPHOTOMÉTRIE VISUELLE.

Dans la photométrie photographique, c'est la plaque qui constitue le récepteur, tandis que, dans la photométrie visuelle, c'est l'œil qui sert de récepteur.

En réalité, l'œil est un récepteur extrêmement sélectif et inégalement sensible aux diverses radiations du spectre visible (52) (53) (54) (55)¹; par conséquent, il n'est pas capable d'évaluer des rapports de flux lumineux, même si ces flux sont de même couleur. Cependant, si deux plages de lumière de même qualité et de même éclairément sont exactement juxtaposées, l'œil peut déceler de très petites variations d'éclairément d'une des deux plages, pourvu que l'autre reste constante, c'est-à-dire qu'il peut constater des égalités et des inégalités de deux flux de même couleur. Il en résulte que toutes les mesures visuelles se font par égalisation, en employant un dispositif qui permette d'obtenir l'égalité. En optique physique, il existe de nombreux travaux photométriques qui ont été effectués visuellement avec une grande précision.

La spectrophotométrie visuelle repose ainsi sur l'égalisation des diverses radiations monochromatiques du spectre visible par affaiblissement d'un des deux flux dans un rapport connu. Pour affaiblir l'intensité de la source lumineuse, on utilise un coin neutre photométrique, divers prismes de polarisation

(1) Les plaques photographiques et les cellules photo-électriques sont aussi sélectives et inégalement sensibles aux différentes longueurs d'onde.

ou un secteur tournant (80); on peut aussi faire varier la distance de la source comme je l'ai mentionné plus haut.

Dans l'étude de la fluorescence de très faible intensité, il ne convient pas d'employer les prismes de polarisation, puisque les prismes devant être interposés sur le trajet de la lumière à étudier¹, diminuent énormément par leur absorption l'intensité de la lumière; l'affaiblissement de l'intensité par variation de la distance de la source n'est pas réalisable non plus pour l'étude de la fluorescence, car, par rapport à la lumière de la fluorescence, la lumière de comparaison est si puissante, que l'on est obligé, pour arriver à égaliser les deux plages de lumière, de prendre de très longues distances absolument impraticables, car elles rendraient l'appareil trop encombrant.

Les autres méthodes ont aussi des inconvénients. La méthode la plus pratique, permettant de faire varier l'intensité de la lumière, consiste à employer un coin neutre photométrique étalonné avec précision pour toutes les longueurs d'onde et pour toutes les épaisseurs².

Au spectrophotomètre, les deux plages juxtaposées

(1) Cette interposition est rendue nécessaire par le fait que la lumière naturelle n'a pas sur les faces de l'appareil dispersif les mêmes facteurs de réflexion que la lumière polarisée, et que les systèmes optiques sur les deux trajets doivent posséder des courbes d'absorption semblables, les prismes de polarisation eux-mêmes n'étant pas neutres pour toutes les longueurs d'onde.

(2) On appelle coins neutres les coins dont l'absorption est la même pour toutes les longueurs d'onde. Aucun des coins présentés actuellement comme neutres ne satisfait en toute rigueur à cette définition.

sont éclairées l'une par la source étalon, l'autre par la lumière à étudier. En amenant ces deux plages à l'égalité d'éclairement au moyen d'un coin étalon, on peut calculer facilement l'intensité de la lumière étudiée pour la longueur d'onde déterminée, étant donné que la densité du coin est le logarithme (dans la base 10) de l'inverse du facteur de transmission.

Je viens d'exposer le principe fondamental de la spectrophotométrie visuelle dont je me suis servi pour ma présente étude; la méthode expérimentale sera étudiée en détail au Chapitre III.

CHAPITRE III

METHODE EXPERIMENTALE

Dans le Chapitre précédent, j'ai mentionné les méthodes spectrophotométriques que l'on peut utiliser pour l'étude d'une lumière d'aussi faible intensité qu'est celle de la fluorescence du sérum. En comparant ces méthodes les unes aux autres pendant la période d'essai, je suis arrivé à constater que la spectrophotométrie visuelle, quoique demandant beaucoup plus de temps que la spectrophotométrie photographique¹, est la mieux appropriée à ce genre de recherches, et cela sans courir le risque d'une altération quelconque des constituants fluorescents du sérum, altération inévitable dans la spectrographie de fluorescence par suite d'une exposition trop prolongée aux rayons ultraviolets.

En outre, l'appareil adopté possédait une grande luminosité, ce qui m'a permis d'effectuer mon travail d'une façon satisfaisante.

1. MONTAGE DU SPECTROPHOTOMÈTRE ADOPTÉ.

Il est évident que, pour l'étude de la lumière extrê-

(1) L'emploi de la méthode photographique permet de rassembler d'un seul coup les éléments d'un grand nombre de mesures.

mement faible de la fluorescence, un appareil dispersif de grande luminosité est absolument nécessaire. Pour obtenir une grande luminosité, il faut que l'appareil ne produise pas de lumière diffuse et soit doué d'une grande dispersion qui permette d'ouvrir la fente largement sans risquer de détruire la pureté spectrale ni le pouvoir de définition. La figure 1 montre schématiquement la partie optique du spectrophotomètre à grande luminosité que j'ai utilisé dans le présent travail, un train de prismes, formé de deux prismes à 60° (P_2 , P_3) placés au minimum de déviation entre deux prismes à 30° (P_1 , P_4), fournissant une grande dispersion dont la courbe est donnée par la figure 2 (voir plus loin).

Comme la lumière diffuse se produit principalement par les réflexions multiples des lentilles interposées dans l'appareil, aucune lentille n'est placée entre les deux fentes (F_1 , F_2); la surface antérieure du premier demi-prisme (P_1) et la surface postérieure du dernier demi-prisme (P_4) sont sphériques et tiennent lieu d'objectifs.

Le chromatisme des dioptries sphériques est compensé par un déplacement corrélatif des quatre prismes et de la dernière fente (F_2): le premier demi-prisme dispersif (P_1) à face d'entrée sphérique, est monté sur un chariot, et se déplace suivant un axe passant par la première fente (F_1); le second prisme (P_2) est mobile autour du point k_1 ; le troisième (P_3) autour du point k_2 près de l'axe de rotation k_3 du dernier demi-prisme (P_4), cet axe k_3

passant par le sommet du dioptré sphérique. L'axe optique principal de ce dioptré passe toujours par la dernière fente (F_2) qui se déplace elle-même sur une came (ca), circulaire et convenablement orientée, la lunette de visée (V) faisant corps avec la fente.

Lorsque l'on déplace la seconde fente le long de la came (ca), un levier télescopique entraîne le prisme P_4 ; une came mue par le prisme P_4 entraîne le prisme P_3 ; un ruban d'acier, fixé sur le bloc de la seconde fente, oblige le prisme P_2 et le chariot du prisme P_1 à suivre le mouvement.

Ces mouvements sont réglés de façon à ce que l'image de la première fente se forme toujours exactement sur la seconde fente, et que les prismes soient toujours traversés par de la lumière parallèle, quelle que soit la région du spectre que l'on étudie.

Le spectre se forme sur un miroir de bronze sphérique (M_1), sur la surface duquel est gravée une échelle millimétrique dont les traits sont parallèles à la seconde fente; cette fente se trouve également au milieu de la surface du miroir qui possède exactement la même courbure que le spectre. Ce miroir renvoie, par l'intermédiaire d'un second miroir (M_2), la lumière dans une lunette auxiliaire coudée (v), à l'aide de laquelle on observe le spectre et la seconde fente.

Pour connaître la longueur d'onde de la raie spectrale tombant sur la fente, il suffit de lire la position occupée sur l'échelle par une raie spectrale, par exemple la raie verte du mercure $\lambda = 546 \text{ m}\mu$, l'appareil étant préalablement étalonné.

Les quelques lignes qui précèdent, indiquent le schéma de la partie dispersive du spectrophotomètre utilisé. La partie photométrique consiste en un coin gris-neutre étalonné (d) placé sur le trajet de la lumière de comparaison (s), et un cube de LUMMER et BRODHUN (c) qui se trouve immédiatement devant la première fente et dont la ligne de séparation des plages est horizontale. Ce dispositif photométrique a été monté dans le but d'augmenter la luminosité, but déjà recherché dans le montage précédemment décrit du spectromètre. Comme je l'ai déjà mentionné plus haut, on pourrait se servir de divers prismes de polarisation au lieu du coin photométrique; mais si l'on utilise les polariseurs pour l'affaiblissement de la lumière de comparaison, ceux que l'on doit également placer sur le trajet de la fluorescence, affaiblissent tellement l'intensité de la lumière étudiée, que la mesure spectrophotométrique est rendue impossible.

La lumière de comparaison (s) éclaire la première fente (F_1) à travers une lentille (L), un prisme (p), un coin gris-neutre étalonné (d) et la partie supérieure du cube de LUMMER, alors que la lumière de fluorescence (s') sortant d'un prisme à réflexion totale, entre dans la première fente par l'intermédiaire de la partie inférieure du cube (voir plus loin).

En regardant dans la lunette de visée (V), on voit un rectangle lumineux séparé en deux par une droite horizontale, et la manipulation consiste à égaliser les brillances de ces deux plages.

Une lampe à mercure (s'') éclaire la première fente à travers un petit prisme (p'), et donne un spectre de référence sur le miroir (M_1) au-dessus des deux spectres juxtaposés.

2. ETALONNAGES.

Le spectrophotomètre adopté étant une combinaison d'un spectromètre et d'un photomètre, l'étalonnage a été fait séparément sur chaque partie de l'appareil.

1° *Étalonnage du spectromètre.*

Ainsi que je l'ai exposé plus haut, la partie dispersive du spectrophotomètre utilisé consiste en quatre prismes qui la dotent d'une grande dispersion. Pour étalonner cet appareil dispersif, j'ai utilisé les raies suivantes d'un arc à mercure :

4046	Å	}	violet extrême
4077			
4108			
4358			violet
4916			bleu vert
5460			vert
5769		}	jaune
5790			
6234			orangé

Comme le spectre du mercure manque de radiation rouge, j'ai employé également la raie 6708 Å du lithium.

En déplaçant la lunette de visée (V) de façon à

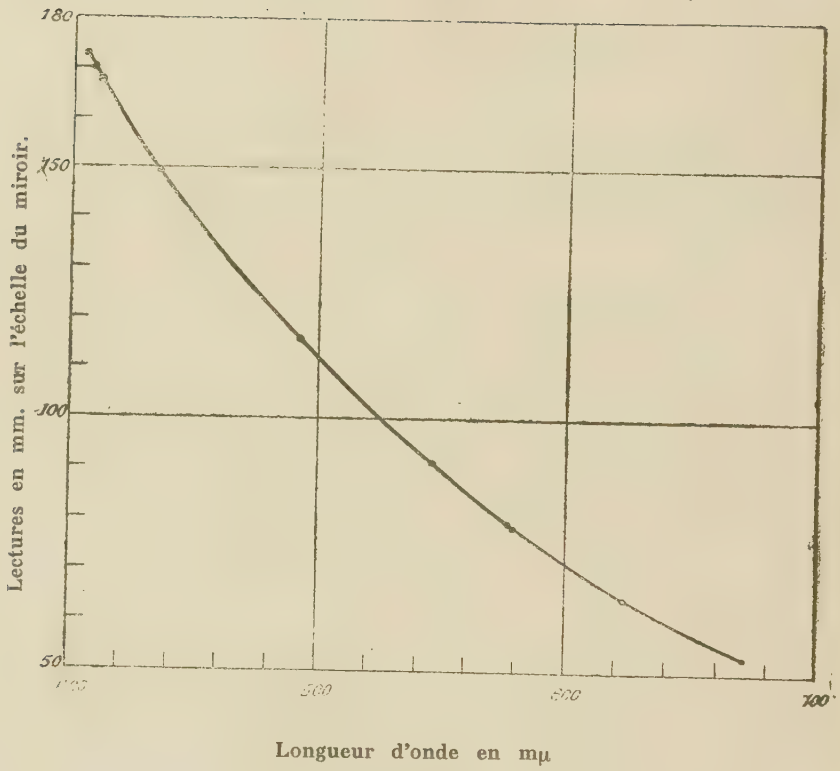


FIG. 2.

laisser tomber chaque raie sur la dernière fente (F_2), j'ai lu sur l'échelle du miroir (M_1) la position de la raie verte ($\lambda = 5460 \text{ \AA}$), par l'intermédiaire de la lunette auxiliaire coudée (v) (voir figure 1).

La figure 2 donne la courbe de dispersion du spectromètre, courbe dont l'abscisse correspond aux longueurs d'onde et l'ordonnée aux lectures en millimètre de la position sur l'échelle de la raie $5460 \text{ \AA}$. L'interpolation permet de connaître avec précision toutes les autres longueurs d'onde contenues dans cette courbe, car la pureté spectrale est toujours maintenue par la grande dispersion de l'appareil.

Au moyen de cette courbe, on sait, par simple lecture de la position de la raie $5460 \text{ \AA}$, quelle est la longueur d'onde de la radiation tombant sur la dernière fente.

2° Etalonnage du coin gris-neutre photométrique.

Le coin gris-neutre monté dans le dispositif photométrique est un verre neutre Schott, homogène et taillé en forme de coin, dont la densité optique va en croissant, d'une manière régulière, d'une extrémité à l'autre, ce qui permet d'égaliser les deux plages photométriques, en faisant glisser le coin de manière à faire intervenir des régions de plus en plus opaques; il est adossé à un coin identique en verre transparent, de façon à ce que l'épaisseur de l'ensemble soit constante sur toute sa longueur.

On sait, cependant, que les coins présentés comme neutres ne le sont pas pour les diverses longueurs

d'onde, c'est-à-dire qu'ils n'ont pas la même absorption pour toutes les radiations monochromatiques du spectre visible; il faut donc étalonner le coin neutre non seulement en fonction de l'épaisseur, mais aussi de la longueur d'onde (51).

La plus grande partie de l'étalonnage du coin peut se faire assez facilement par calculs. A l'aide d'un autre spectrophotomètre, on mesure les densités optiques du coin pour une épaisseur donnée en fonction de la longueur d'onde, et l'on mesure aussi les densités optiques du coin pour une longueur d'onde donnée en fonction de l'épaisseur; on finit par obtenir deux courbes (figures 3 et 4), dont l'une est une droite, car, pour une longueur d'onde donnée, la densité d'un coin homogène et bien taillé croît linéairement en fonction de son épaisseur.

Pour étalonner toutes les autres radiations monochromatiques, on effectue les calculs de la façon suivantes :

Au point A, situé sur la courbe 2, correspondent l'épaisseur x_1 et la densité D'_{λ_1} , cela pour la longueur d'onde λ_1 ; soient sur la courbe 1 les densités D_{λ_1} et D_{λ_2} correspondant aux longueurs d'onde λ_1 et λ_2 ; on obtient le point B de la courbe pointillée 3 en menant de A une parallèle à l'ordonnée et en prenant pour D'_{λ_2} une valeur telle que :

$$D'_{\lambda_2} = D'_{\lambda_1} \frac{D_{\lambda_2}}{D_{\lambda_1}},$$

et de la même façon on obtient le point F de la courbe 3 correspondant à l'épaisseur x_2 .

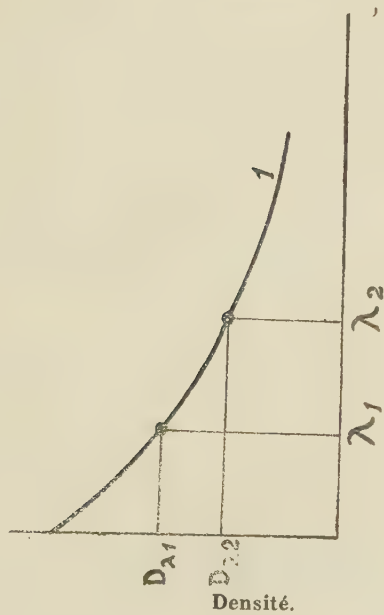


Fig. 3.

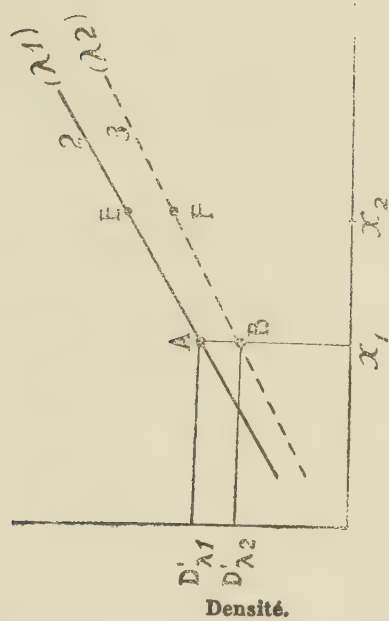


Fig. 4.

A l'aide des deux points B et F ainsi obtenus, on établit, pour la longueur d'onde λ_2 , la courbe d'étalonnage 3 qui est une droite comme la courbe 2; les autres longueurs d'onde sont étalonnées exactement de la même manière.

Pour étalonner le coin neutre monté dans le dispositif photométrique de mon appareil, j'ai utilisé le spectrophotomètre Yvon (81); les figures 5 et 6 donnent les courbes obtenues expérimentalement, courbes qui ont permis d'établir par calculs un groupe de courbes d'étalonnage (figure 7) ¹.

Il est à remarquer que la transmission du coin neutre utilisé croît dans la région rouge du spectre visible.

Au moyen d'un coin photométrique étalonné avec précision, aussi bien en fonction de son déplacement que de la longueur d'onde, on peut réduire, dans un rapport connu, l'intensité de la lumière de comparaison de façon à l'amener à être égale à celle de la lumière de fluorescence. En se servant des courbes de la figure 7, on obtient facilement par simple calcul l'intensité de la lumière de fluorescence pour la longueur d'onde observée.

3° Etalonnage des écrans absorbants complémentaires.

L'intensité de la lumière de comparaison étant trop grande, pour que l'on puisse l'amener, au moyen

(1) La graduation de l'abscisse ne correspond pas à l'épaisseur du coin, mais à une graduation proportionnelle à cette épaisseur donnée par l'échelle accolée au coin.

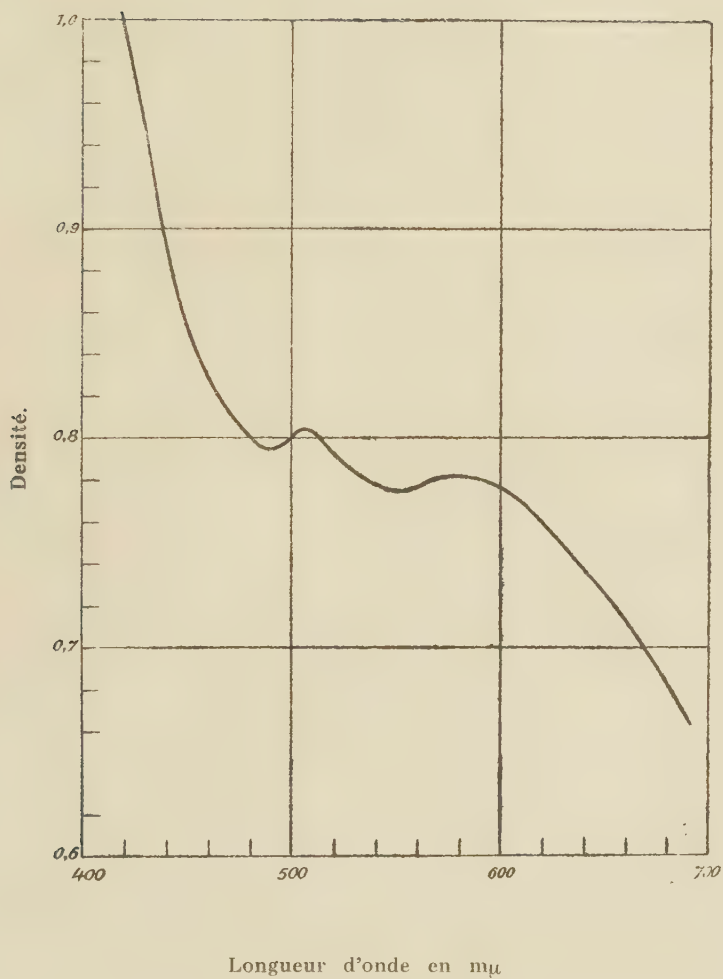
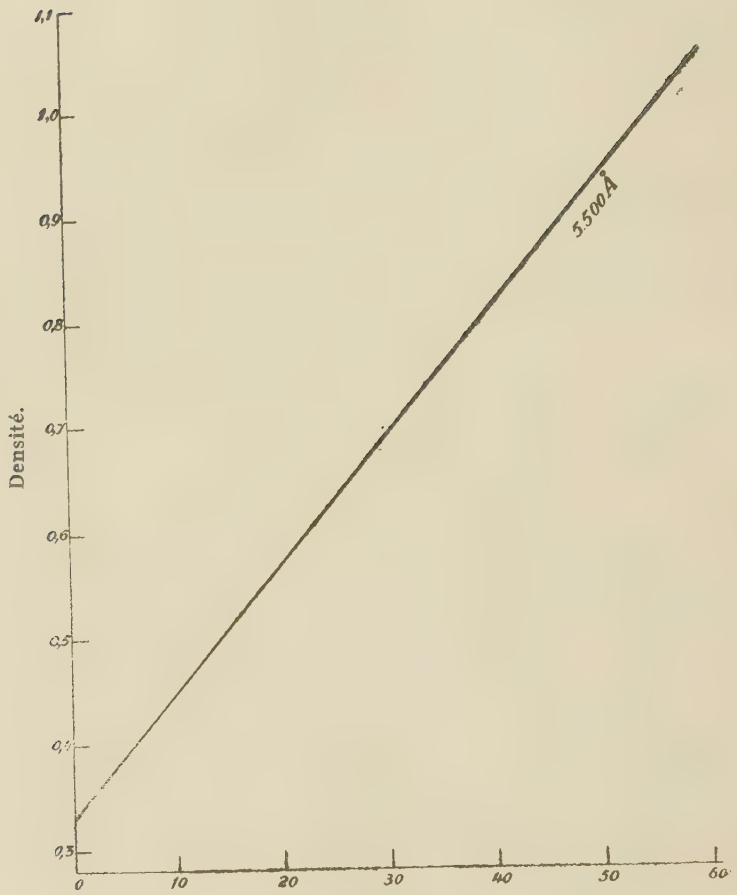
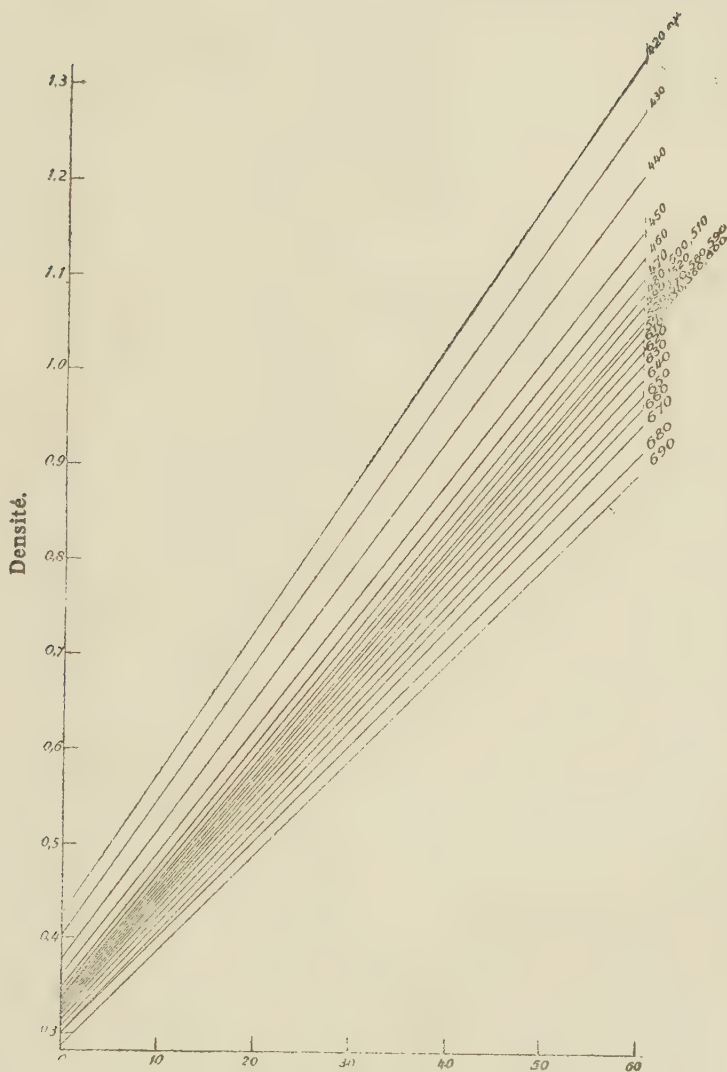


FIG. 5.



Lectures en mm. sur l'échelle du coin photométrique.

FIG. 6.



Lectures en mm. sur l'échelle du coin photométrique.

FIG. 7.

d'un seul coin neutre photométrique, à être égale à l'intensité extrêmement faible de la lumière de fluorescence, j'ai employé, d'une façon complémentaire, quatre écrans absorbants de différentes densités ($1 \frac{1}{2}$, 2, 3, 4) pour faciliter l'égalisation spectrophotométrique; ce sont des plaques photographiques qui ont subi des impressions uniformes, et dont le verre n'a aucun défaut optique, tels que bulles, stries, etc.

Pour étalonner ces quatre écrans absorbants complémentaires, j'ai utilisé également le spectrophotomètre Yvon. J'ai constaté que ces écrans sont tous neutres pour toutes les radiations visibles, sauf dans la région rouge où la densité est un peu moins grande. Il est intéressant de constater que les clichés photographiques sont beaucoup moins éloignés de la teinte neutre, du moins dans le spectre visible, que les coins photométriques présentés actuellement comme neutres.

Dans les calculs, j'ai effectué, bien entendu, la correction nécessaire de densité des écrans pour les grandes longueurs d'onde qui subissent une moindre absorption que les autres radiations visibles.

3. SOURCE DE LUMIÈRE DE COMPARAISON.

Ainsi que je l'ai déjà exposé au Chapitre II, la meilleure source de comparaison est le corps noir dont on peut tracer, par calculs, la courbe spectrale d'énergie à une température donnée. Mais, pour la spectrophotométrie dans le visible, il est pratique-

ment commode d'utiliser une lampe à incandescence pour la comparaison spectrophotométrique. On peut calculer également l'émission spectrale d'énergie de la lampe par sa température de couleur équivalente, température à laquelle le corps noir donne un rayonnement visible de même composition spectrale que la lampe.

Comme lampe étalon, les lampes à filament plat de tungstène ont, dans la pratique courante, des avantages sur les autres modèles (82).

1° Description de la source de comparaison.

La source lumineuse de comparaison utilisée est, comme je l'ai déjà dit, une lampe à ruban de tungstène à atmosphère gazeuse dont la consommation électrique en régime normal est d'environ 17 ampères sous 6 volts dans ses conditions habituelles d'emploi. Pour éviter le noircissement progressif de l'ampoule pendant la durée des mesures, la lampe était alimentée, durant toute l'expérience, par un courant de 11 ampères, courant qui est sensiblement au-dessous du régime normal d'utilisation.

Il va sans dire qu'avant l'usage la lampe a été préalablement vieillie par la mise sous un régime un peu supérieur au régime normal pendant 48 heures.

Ayant acquis un vieillissement stable, la lampe a été étalonnée pyrométriquement en comparaison avec des lampes étalons du Laboratoire des Hautes Températures de Paris; la température de couleur équi-

valente a été trouvée égale à 2150° K avec un courant de 11 ampères à l'ampèremètre utilisé dans mes mesures.

Pour maintenir constante l'intensité du courant au cours de l'expérience, j'ai intercalé dans le circuit une résistance facilement réglable ainsi qu'un ampèremètre de précision, l'intensité lumineuse de la source variant plus rapidement avec l'intensité du courant qu'avec la tension.

Chaque mesure spectrophotométrique n'a été entreprise qu'après 15 minutes d'allumage, temps qui permet à la lampe d'atteindre la température d'un régime donné (82).

2° Répartition spectrale d'énergie de la source de comparaison.

Une fois la température de couleur de la source connue, on peut calculer sa répartition spectrale d'énergie en se servant des formules relatives au rayonnement du corps noir (formule de PLANCK ou celle de WIEN).

La formule de PLANCK (83) exprimant l'intensité d'énergie E_λ ¹ du rayonnement d'un corps noir à la

(1) On peut employer d'autres grandeurs, par exemple la radiance spectrale r_λ ou la brillance spectrale b_λ , qui sont reliées à l'intensité : $r_\lambda = \pi b_\lambda$; $b_\lambda = \frac{E_\lambda}{S \cos \theta}$, S étant la surface utilisée

de la source (petite par rapport à la distance), θ l'angle de la direction avec la normale à la surface. Pour passer d'une grandeur photométrique à une autre, il suffit de changer la constante K dans le même rapport. Ces questions sont traitées en détail dans l'ouvrage « Introduction Générale à la Photométrie » du Professeur Fabry, Chapitres II et VII (Editions de la Revue d'Optique, 1927).

température absolue T pour la longueur d'onde λ en microns prend la forme :

$$E_{\lambda} = K \frac{\lambda^{-5}}{e^{\frac{c}{\lambda T}} - 1}$$

e étant la base des logarithmes népériens (2,71828...), K et C deux constantes dont les valeurs les plus probables sont (84), (85) :

$$K = 3,703.10^{-5} \text{ erg. sec. par cm}^2.$$

$$C = 14330 \text{ micron-degré.}$$

La formule de PLANCK qui est dérivée de la théorie des quanta introduite dans les théories mécaniques et électromagnétiques classiques (86), (87), (88), se trouve en très bon accord avec les mesures expérimentales sur le rayonnement du corps noir (89), et cela pour toutes les longueurs d'onde (90).

Cependant, la formule suivante, proposée par W. WIEN (91) :

$$E_{\lambda} = K\lambda^{-5} e^{-\frac{C}{\lambda T}}$$

présente, sur celle de PLANCK, l'avantage d'être plus simple à appliquer. Elle représente très convenablement la distribution d'énergie, à condition de ne pas l'appliquer aux radiations de trop grande longueur d'onde. D'ailleurs, les deux formules coïncident pratiquement pour les températures habituelles dans le visible et l'ultra-violet (92). C'est cette formule que j'ai utilisée pour calculer la distribution spectrale d'énergie de la source de comparaison.

La source de comparaison utilisée a une température de couleur de 2150° K, donc $\frac{C}{T} = 6,6651$. Quand il s'agit d'intensités relatives, on n'a pas besoin de tenir compte de la constante K, puisque l'on considère le rapport des intensités; en écrivant la formule de WIEN sous la forme logarithmique, on a

$$\log_{10} E = -5 \log_{10} \lambda - \frac{C}{\lambda T} \log_{10} e.$$

En substituant les valeurs numériques :

$$\frac{C}{T} = 6,6651 \text{ et } \log_{10} e = 0,43429,$$

on obtiendra :

$$\log_{10} E_{\lambda} = -5 \log_{10} \lambda - \frac{2,8946}{\lambda}.$$

Le Tableau 1 donne les résultats de ces calculs logarithmiques.

Or, comme on ne cherche que l'intensité d'énergie relative, il suffit d'avoir les rapports de l'énergie entre diverses longueurs d'onde. On peut donc prendre comme unité arbitraire d'énergie, le nombre de la longueur d'onde $\lambda = 0,40 \mu$; il s'agit alors de trouver le rapport de l'énergie de chaque radiation monochromatique à celle de la radiation $\lambda = 0,40 \mu$, c'est-

à-dire le rapport $\frac{E_{\lambda}}{E_{0,40 \mu}}$. Puisque l'on connaît les va-

TABLEAU I.

λ en microns	$\log_{10} \lambda$	$-5 \log_{10} \lambda$	$\frac{2,8946}{\lambda}$	$\log_{10} E_{\lambda} =$ $-\frac{5 \log_{10} \lambda}{2,8946}$
0,40	— 0,39794	1,98970	7,23650	— 5,24680
0,41	— 0,38722	1,93610	7,06000	— 5,12390
0,42	— 0,37675	1,88375	6,89190	— 5,00815
0,43	— 0,36653	1,83265	6,73163	— 4,89898
0,44	— 0,35655	1,78275	6,57864	— 4,79589
0,45	— 0,34679	1,73395	6,43244	— 4,69849
0,46	— 0,33724	1,68620	6,29261	— 4,60641
0,47	— 0,32790	1,63950	6,15872	— 4,51922
0,48	— 0,31876	1,59380	6,03042	— 4,43662
0,49	— 0,30980	1,54900	5,90735	— 4,35835
0,50	— 0,30103	1,50515	5,78920	— 4,28405
0,51	— 0,29243	1,46215	5,67569	— 4,21354
0,52	— 0,28400	1,42000	5,56654	— 4,14654
0,53	— 0,27572	1,37860	5,46151	— 4,08291
0,54	— 0,26761	1,33805	5,36037	— 4,02232
0,55	— 0,25964	1,29820	5,26291	— 3,96471
0,56	— 0,25181	1,25905	5,16893	— 3,90988
0,57	— 0,24413	1,22065	5,07825	— 3,85760
0,58	— 0,23657	1,18285	4,99069	— 3,80784
0,59	— 0,22915	1,14575	4,90610	— 3,76035
0,60	— 0,22185	1,10925	4,82433	— 3,71508
0,61	— 0,21467	1,07335	4,74525	— 3,67190
0,62	— 0,20761	1,03805	4,66871	— 3,63066
0,63	— 0,20066	1,00330	4,59460	— 3,59130
0,64	— 0,19382	0,96910	4,52281	— 3,55371
0,65	— 0,18709	0,93545	4,45323	— 3,51778
0,66	— 0,18046	0,90230	4,38576	— 3,48346
0,67	— 0,17393	0,86965	4,32030	— 3,45065
0,68	— 0,16749	0,83745	4,25676	— 3,41931
0,69	— 0,16115	0,80575	4,19507	— 3,38932
0,70	— 0,15490	0,77450	4,13514	— 3,36064
0,71	— 0,14874	0,74370	4,07690	— 3,33320
0,72	— 0,14267	0,71335	4,02028	— 3,30693
0,73	— 0,13668	0,68340	3,96521	— 3,28181
0,74	— 0,13077	0,65385	3,91162	— 3,25777
0,75	— 0,12494	0,62470	3,85947	— 3,23477
0,76	— 0,11919	0,59595	3,80868	— 3,21273
0,77	— 0,11351	0,56755	3,75922	— 3,19167
0,78	— 0,10791	0,53955	3,71103	— 3,17148
0,79	— 0,10237	0,51185	3,66405	— 3,15220
0,80	— 0,09691	0,48455	3,61825	— 3,13370

TABLEAU II.

λ en microns	$\log_{10} \frac{E_{\lambda}}{E_{0,40} \mu}$	Energie relative
0,40	0,00000	1,000
0,41	0,12290	1,327
0,42	0,23865	1,732
0,43	0,34782	2,228
0,44	0,45091	2,824
0,45	0,54831	3,534
0,46	0,64039	4,369
0,47	0,72758	5,341
0,48	0,81018	6,459
0,49	0,88845	7,735
0,50	0,96275	9,178
0,51	1,03326	10,80
0,52	1,10026	12,60
0,53	1,16389	14,58
0,54	1,22448	16,77
0,55	1,28209	19,15
0,56	1,33692	21,72
0,57	1,38920	24,50
0,58	1,43896	27,48
0,59	1,48645	30,65
0,60	1,53172	34,02
0,61	1,57490	37,58
0,62	1,61614	41,32
0,63	1,65550	45,24
0,64	1,69309	49,33
0,65	1,72902	53,58
0,66	1,76334	57,99
0,67	1,79615	62,54
0,68	1,82749	67,22
0,69	1,85748	72,03
0,70	1,88616	76,94
0,71	1,91360	81,96
0,72	1,93987	87,07
0,73	1,96499	92,26
0,74	1,98903	97,51
0,75	2,01203	102,8
0,76	2,03407	108,2
0,77	2,05513	113,5
0,78	2,07532	118,9
0,79	2,09460	124,3
0,80	2,11310	129,7

leurs $\log_{10} E_{\lambda}$ et $\log_{10} E_{0,40 \mu}$, on n'a, pour cela, qu'à se rappeler la formule bien connue suivante :

$$\log_{10} E_{\lambda} - \log_{10} E_{0,40 \mu} = \log_{10} \frac{E_{\lambda}}{E_{0,40 \mu}},$$

ce qui permet d'obtenir facilement la valeur cherchée, c'est-à-dire l'intensité d'énergie relative de toutes les longueurs d'onde.

Dans la troisième colonne du Tableau II se trouve l'intensité énergétique relative en fonction de la longueur d'onde de la source de comparaison utilisée.

En établissant une courbe avec les valeurs obtenues, on peut connaître par interpolation les valeurs de l'intensité énergétique relative des autres longueurs d'onde non indiquées dans la première colonne du Tableau II.

Quand on fait la détermination directe de la distribution énergétique spectrale d'un rayonnement, il faut se rendre compte que les diverses radiations n'ont plus les mêmes valeurs relatives, que celles qui figurent dans le tableau, lorsqu'elles ont traversé l'appareil dispersif à prismes, car les intensités énergétiques des radiations subissent dispersion, absorption et réflexion de la part de l'appareil à des degrés différents.

Cependant, dans la mesure du rayonnement par comparaison spectrophotométrique avec une source étalon, on n'a pas besoin de tenir compte de ces propriétés sélectives de l'appareil, puisque les deux faisceaux de lumière, celui du rayonnement étalon et celui du rayonnement à mesurer, suivent des chemins

identiques et subissent par conséquent un affaiblissement dans le même rapport.

Lorsque l'on a besoin de faire des calculs pour obtenir la répartition énergétique spectrale du rayonnement du corps noir à différentes températures, il est plus commode d'utiliser les tables (93), (94), (95), (96), qui donnent les valeurs relatives du rayonnement intégral pour les diverses longueurs d'onde à des températures données ¹.

M. FABRY (92) a préparé une table à l'aide de laquelle on peut obtenir très facilement, par simple calcul, les valeurs de l'énergie spectrale du rayonnement intégral pour toutes les températures.

4. SOURCE DE RADIATION EXCITATRICE.

On sait que diverses sources de lumière, telles que la lampe quartz-mercure, l'arc au charbon ou au fer et l'étincelle jaillissant entre des électrodes métalliques, émettent en abondance des rayons ultraviolets. Il est évident que, dans l'étude spectrophotométrique des fluorescences, la source de radiation excitatrice doit remplir des conditions très importantes, à savoir : constance du rayonnement excitateur, intensité rayonnante aussi puissante que possible dans la mesure où elle ne cause aucune altération à l'échan-

(1) Bien entendu, la formule de Wien que je viens d'utiliser dans ces calculs, n'est applicable qu'aux régions visible et ultraviolette du rayonnement intégral aux températures habituelles.

tillon au cours de l'expérience¹ et absence de rayons visibles et infrarouges.

Comme source d'excitation de la fluorescence, l'arc au charbon ou au fer et l'étincelle métallique ne conviennent pas par suite du manque de stabilité de leur rayonnement.

On préfère généralement l'arc à vapeur de mercure à cause de sa fixité de rayonnement et de ses commodités d'emploi. La raie 3650 Å. dans le rayonnement ultraviolet de l'arc à mercure possède une grande intensité et excite de la manière la plus intense la plupart des fluorescences biologiques; on peut la séparer facilement du spectre du mercure au moyen d'un filtre à l'oxyde de nickel (7). Aussi ai-je choisi, pour ma présente étude, une lampe quartz-mercure à grand éclat comme source de radiation excitatrice de la fluorescence.

Le brûleur utilisé était alimenté par un courant continu de 110 volts fourni par une série d'accumulateurs à grande capacité, sa consommation électrique étant de 300 watts; un rhéostat de réglage intercalé dans le circuit et un voltmètre de précision branché parallèlement aux bornes du brûleur ont permis de contrôler rigoureusement la tension.

Immédiatement après l'allumage de l'arc, la tension aux bornes du brûleur tombe presque à 0, puis croît progressivement jusqu'à atteindre une valeur constante. Au contraire, l'intensité du courant baisse

(1) On pourrait naturellement renouveler l'échantillon altéré, mais il faudrait en posséder une quantité suffisante.

au fur et à mesure que l'arc devient plus stable. Au bout de 15 minutes, la tension reste constante à 60 volts et l'ampèremètre intercalé aussi dans le circuit marque 5 ampères. C'est le moment où l'arc est devenu stable et par conséquent le rayonnement de la source est constant.

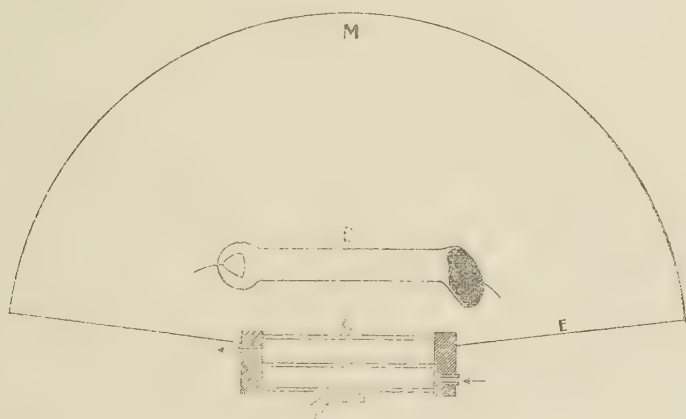
Du fait que l'intensité lumineuse des arcs à vapeur de mercure, comme celle des tubes luminescents à gaz ou à vapeur, dépend plutôt du voltage que de l'intensité du courant qui varie très peu, après l'établissement du régime adopté (97), (98), (99), (100), j'ai maintenu rigoureusement constante la tension aux bornes du brûleur pendant toute l'expérience.

Pour utiliser au maximum le rayonnement excitateur du brûleur, je me suis servi d'un miroir chromé elliptique¹ dont la distance focale au premier foyer est de 17 cm., la distance des foyers de 7 cm., et l'ouverture de 40 cm.; le brûleur est placé au premier foyer du miroir et l'échantillon au deuxième. La surface couverte par ce miroir elliptique s'étendant sur 180°, son emploi permet donc de concentrer la moitié du rayonnement du brûleur au deuxième foyer.

Pour absorber les rayons infrarouges émis par la source et empêcher l'échauffement de la matière étudiée, une cuve à circulation d'eau est interposée entre le brûleur et l'échantillon; la cuve, en laiton, est fermée par deux disques de verre Pyrex de 2 mm.

(1) L'aluminium est très employé pour le réflecteur des lampes au mercure, mais le chrome qui a l'avantage d'être peu altérable, possède le même pouvoir réflecteur que lui dans l'ultra-violet (101) (102).

d'épaisseur et de 90 mm. de diamètre, la distance qui sépare les deux faces internes des fenêtres étant de 30 mm. Un écran de Wood de 3 mm. d'épaisseur immergé au milieu de la cuve et une enveloppe métallique couvrant le miroir réflecteur permettent d'éliminer parfaitement tous les rayons visibles qui pourraient introduire des erreurs dans l'observation de la fluorescence (voir figure 8).



M, Miroir elliptique; B, Brûleur;
C, Cuve à circulation d'eau; E, Enveloppe métallique;
c, cuve à liquides; p, prisme à réflexion totale.

FIG. 8.

On pourrait employer, pour l'élimination des rayons visibles de l'arc à mercure, soit un monochromateur, soit divers écrans absorbants (103), (7), mais le premier a l'inconvénient d'exiger un appareillage un peu compliqué et de faire perdre beaucoup de lumière. Parmi les divers écrans absorbants, le verre à base d'oxyde de nickel portant le nom de filtre de

Wood, est le plus commode à employer dans l'étude des fluorescences biologiques; il absorbe presque totalement les rayons visibles, laissant passer les radiations inférieures à 3800 Å environ et un peu d'extrême rouge. Ce dernier peut être écarté, pour obtenir un rayonnement purement ultraviolet, par une cuve contenant une solution de Cu So_4 à 10 % ou par un verre coloré au cuivre, mais ces procédés font également subir une forte absorption à l'ultra-violet. D'après R. W. Wood (7), inventeur du verre à l'oxyde de nickel, le procédé le plus efficace pour supprimer les radiations rouges consiste à augmenter l'épaisseur de ce verre, jusqu'à ce qu'elles ne passent plus. Il se produit, naturellement, aussi une diminution dans l'intensité de l'ultraviolet, mais elle n'est pas aussi grande que lorsque l'on élimine le rouge par quelque autre matière colorante.

D'ailleurs, l'arc au mercure est très pauvre en radiation rouge; la puissante raie ultraviolette ($\lambda = 3650$ Å) dans son spectre tombe exactement au centre de la bande de transmission du verre à l'oxyde de nickel.

C'est la raison pour laquelle j'ai utilisé un verre de Wood qui m'a permis d'éliminer complètement le rayonnement visible du mercure. Le rayonnement excitateur ainsi obtenu est presque uniquement constitué par la radiation de longueur d'onde : 3650 Å.

La figure 9 donne le schéma de la cuve à eau courante dont les deux faces parallèles sont en verre Pyrex. Tout échauffement de l'échantillon est évité par l'interposition de cette cuve, et tout le rayonne-

ment visible de l'arc au mercure est éliminé par l'écran de Wood qui y est immergé.

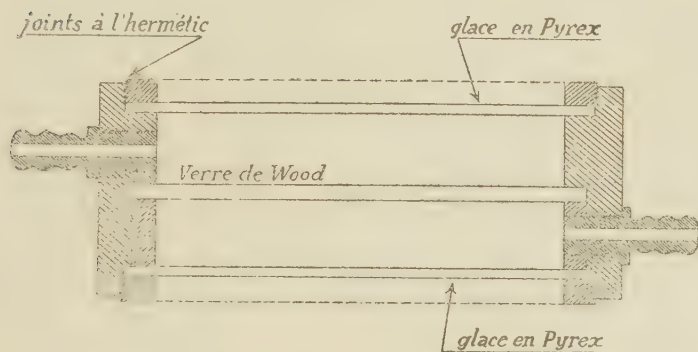


FIG. 9.

J'ai ainsi obtenu une source de radiation ultraviolette à grande intensité qui a excité une forte fluorescence des sérums, sans que la matière étudiée s'altère au cours des mesures spectrophotométriques.

5. CUVE A LIQUIDES.

La cuve à liquides dans laquelle est placé le sérum à étudier est également en verre Pyrex, lequel n'est pas fluorescent sous la radiation excitatrice utilisée. Etant fixée directement sur la face extérieure de la cuve à circulation d'eau, elle se trouve exactement au deuxième foyer du miroir elliptique.

La lumière de fluorescence excitée par la radiation ultraviolette concentrée se projette dans l'appareil dispersif par l'intermédiaire d'un prisme à réflexion

totale accolé à une face latérale de la cuve à liquides (voir figure 8). Le prisme à réflexion totale est situé immédiatement devant le cube de LUMMER et BRODHUN du spectrophotomètre (voir figure 1); la paroi interne des deux faces non utilisées de la cuve est argentée¹, et la paroi externe recouverte d'un vernis noir.

Les dimensions de la cuve à liquides sont : largeur 19 mm., épaisseur 6 mm. et hauteur 20 mm., 2 centimètres cube de sérum suffisant donc largement pour l'observation spectrophotométrique de la fluorescence.

Il va sans dire que la cuve à liquides doit être tenue dans un état de propreté absolue.

Après avoir effectué les mesures d'un sérum, on vide la cuve, puis on la nettoie soigneusement avec une solution aqueuse de chlorure de sodium à 8 gr. par litre (solution salée physiologique).

6. PRÉPARATION DE SÉRUMS.

Le sang est recueilli dans un tube à essai stérilisé à sec au four électrique; on le laisse à la température ambiante. Au bout de 24 heures ou parfois plus, lorsque le sérum est bien isolé, on le recueille à l'aide d'une pipette stérilisée elle aussi par la chaleur sèche et on le verse dans la cuve à liquides pour procé-

(1) Ce procédé est destiné à faire entrer le plus possible de la lumière de fluorescence dans le spectromètre.

der immédiatement à la mesure spectrophotométrique de sa fluorescence.

Ce procédé de préparation évite aussi bien l'hémolyse que la prolifération microbienne dans la matière à étudier.

J'ai opéré sur 43 sérums humains et animaux groupés dans le Tableau III, les sujets utilisés étant considérés comme sains; ces sérums normaux et non hémolysés ont été examinés à l'état stérile.

7. MANIPULATION.

Tels sont le spectrophotomètre, les sources de lumière de comparaison et d'excitation, la cuve à liquides utilisée ainsi que les sérums examinés.

L'appareil étant étalonné et mis au point, et les deux sources lumineuses étant maintenues constantes, on peut procéder à l'observation de la fluorescence, aussitôt que le sérum est préparé.

Toutefois, afin d'obtenir une plus grande précision, il convient, avant de commencer les mesures spectrophotométriques, d'attendre une vingtaine de minutes, pour que l'œil soit complètement adapté à l'obscurité. Il faut se rendre compte que la moindre lumière filtrant dans la chambre noire où l'on travaille, et la fatigue pourraient apporter des erreurs dans les mesures.

Toutes ces précautions étant prises, les résultats obtenus sont toujours très précis. J'ai constaté bien

TABLEAU III.

Numéro des échan- tillons	Sujet	Sexe	Figure 1	Numéro des échan- tillons	Sujet	Sexe	Figure 1
1	Homme (20 ans)	♂	10	23	Bœuf	♂	32
2	id. (40 ans)	♀	11	24	Mouton	♀	33
3	id. (25 ans)	♀	12	25	id.	♂	34
4	id. (40 ans)	♀	13	26	id.	♀	35
5	id. (60 ans)	♀	14	27	Chèvre	♀	36
6	id. (35 ans)	♀	15	28	id.	♂	37
7	id. (35 ans)	♀	16	29	id.	♂	38
8	id. (20 ans)	♀	17	30	Porc	♂	39
9	id. (35 ans)	♀	18	31	id.	♂	40
10	id. (65 ans)	♀	19	32	id.	♀	41
11	id. (57 ans)	♀	20	33	Lapin	♀	42
12	id. (36 ans)	♀	21	34	id.	♂	43
13	id. (50 ans)	♀	22	35	id.	♀	44
14	id. (30 ans)	♀	23	36	id.	♀	45
15	id. (40 ans)	♀	24	37	id.	♂	46
16	id. (50 ans)	♀	25	38	id.	♀	47
17	Cheval	♀	26	39	Cobaye	♀	48
18	id.	♀	27	40	id.	♂	49
19	id.	♀	28	41	id.	♂	50
20	id.	♀	29	42	id.	♀	51
21	Bœuf	♀	30	43	Coq	♂	52
22	id.	♀	31				

(1) Les chiffres de cette colonne correspondent aux numéros des figures que l'on trouvera dans le chapitre suivant.

des fois que le premier pointé expérimental coïncidait exactement avec les quatre autres pointés de mesures effectuées sur le même sérum ¹.

Il est évident que le travail est très pénible, quand l'expérimentateur doit, en même temps qu'il effectue les mesures, régler les courants traversant les sources de lumière. Cette difficulté peut être écartée, si un aide est chargé du réglage des courants.

En affaiblissant la lumière de comparaison à l'aide du dispositif photométrique, on égalise au spectromètre les deux plages, celle provenant de la lumière de fluorescence et celle provenant de la lumière de comparaison; on examine ainsi la lumière de fluorescence, radiation par radiation dans le spectre visible.

Au cours des mesures spectrophotométriques, on obtient, pour chaque longueur d'onde observée, deux densités optiques, une du coin photométrique et l'autre de l'écran neutre absorbant (voir plus haut); on les additionne pour obtenir la densité qui a permis d'égaliser l'intensité de la lumière de comparaison à celle de la fluorescence.

On sait que :

$$\text{Densité} = \log_{10} \frac{\text{intensité incidente}}{\text{intensité transmise,}}$$

donc :

$$\text{Densité} = \log_{10} \frac{\text{intensité de la lumière de comparaison}}{\text{intensité de la lumière de fluorescence.}}$$

(1) Dans la présente étude, tous les résultats sont la moyenne de 5 pointés expérimentaux.

La courbe spectrale énergétique de la source de comparaison étant connue, on obtiendra, par calcul, l'intensité d'énergie de la fluorescence pour la longueur d'onde examinée.

CHAPITRE IV

RESULTATS OBTENUS ET DISCUSSION

Tous les sérums examinés manifestent, sous l'influence du rayonnement ultraviolet, une fluorescence plus ou moins intense de couleurs peu variées. Comme je l'ai déjà exposé, il est inutile d'essayer de décrire les teintes de la fluorescence observée à l'œil nu.

Les valeurs obtenues dans les mesures spectrophotométriques sont présentées directement sous forme de graphiques en raison des avantages que ceux-ci offrent au point de vue de la clarté. Les figures 10 à 52 montrent les courbes spectrales d'intensité énergétique¹ de la fluorescence des sérums examinés. Ces courbes représentent donc la répartition de l'énergie en fonction de la longueur d'onde dans le spectre continu de la fluorescence des sérums, les ordonnées étant exprimées en unités arbitraires.

Il va sans dire que l'aire de chaque courbe est proportionnelle à l'intensité énergétique totale de la fluorescence.

(1) Si l'on veut obtenir l'intensité lumineuse au lieu de l'intensité énergétique, on n'a qu'à multiplier la valeur de celle-ci pour chaque longueur d'onde par le facteur de visibilité correspondant, et l'on obtiendra une courbe spectrale de l'intensité lumineuse de la fluorescence.

Il est à remarquer que le spectre de la fluorescence émise par les sérums de l'Homme et des mammifères comprend deux bandes d'émission très marquées, alors que le spectre du sérum de Coq en possède trois. La position de l'axe de ces bandes varie suivant l'espèce considérée; il existe cependant des sérums donnant une fluorescence dont les maxima d'intensité d'émission coïncident avec ceux d'autres sérums.

Le Tableau IV donne les longueurs d'onde auxquelles correspondent les maxima d'intensité d'émission dans le spectre de la fluorescence des sérums étudiés.

TABLEAU IV.

Sujet	Longueur d'onde correspondant à l'axe de la première bande.	Longueur d'onde correspondant à l'axe de la deuxième bande.
Homme ...	480 mμ	540 mμ
Cheval	440	540
Bœuf	460	540
Mouton ...	480	516
Chèvre	480	530
		(540) un cas
Porc	480	510
Lapin	480	510
	(460) deux cas	
Cobaye	480	510
		(530) un cas
Coq ¹	460	520

(1) L'axe de la troisième bande du Coq correspond à $\lambda = 560$ mμ.

Les chiffres entre parenthèses proviennent de quatre échantillons probablement pathologiques.

Le type de la courbe spectrale énergétique de la fluorescence est caractéristique chez le Cheval, le Bœuf, la Chèvre, le Lapin et le Coq. Dans le cas du Lapin, l'intensité de la première bande est plus grande que celle de la deuxième.

Les sérums du Cheval et du Bœuf possèdent des courbes de fluorescence semblables, mais les longueurs d'onde du maximum d'intensité de la première bande ne sont pas identiques.

L'intensité de la fluorescence est très faible chez la Chèvre et le Coq. L'intensité énergétique totale de la fluorescence émise par le sérum de la même espèce dépend de l'individu, mais la position de l'axe des bandes ne change pas, sauf pour quelques sérums d'animaux considérés comme sains, mais probablement pathologiques.

Dans mes conditions d'observations, l'exposition des sérums à l'action du rayonnement ultraviolet ne modifie pas la courbe spectrale d'énergie de la fluorescence. La figure 46 bis représente la courbe spectrale de fluorescence du même sérum que celui de la figure 46, mais obtenue après 10 heures d'exposition.

En observant les courbes 10 à 52, on constate que, jusqu'à un certain point, on peut distinguer les unes des autres les espèces de sérum d'après le type de la courbe. J'ai déjà signalé que plusieurs auteurs ont décelé, par simple observation à l'œil nu de la fluo-

rescence, la présence de certains constituants anormaux dans le sérum (voir Chapitre I). Dans les maladies altérant l'état colloïdal ou la composition du sérum, il est extrêmement probable que la courbe de la fluorescence est modifiée; on trouverait soit un déplacement de la longueur d'onde du maximum d'intensité, soit un changement de la forme de la courbe. Il faudra donc examiner ultérieurement les sérums pathologiques en se servant comme base des courbes que j'ai obtenues.

Etant donné que la courbe fournie par le sérum du Coq présente une particularité très caractéristique, il serait intéressant, du point de vue purement biologique, de comparer les courbes de fluorescence des mammifères non seulement avec celles des oiseaux, mais aussi avec celles des animaux à sang froid (Batraciens, Reptiles, etc.).

Une substance pure de constitution chimique connue est, en général, bien définie par son spectre d'absorption. Elle peut être définie également par son spectre d'émission, si elle est phosphorescente ou fluorescente. Cependant, on sait que la composition du sérum sanguin est d'une complexité extrême (albumines, globulines, lipoïdes, glucose, sels, etc.); la constitution chimique des protides du sérum n'est à l'heure actuelle pas encore bien connue. Il importe donc de se rendre compte que la lumière de la fluorescence du sérum est la résultante des fluorescences émises par ses divers constituants. Il reste, par conséquent, encore beaucoup à faire pour isoler les dif-

férentes fluorescences contribuant à former le spectre d'émission dont j'ai étudié ici la distribution d'énergie.

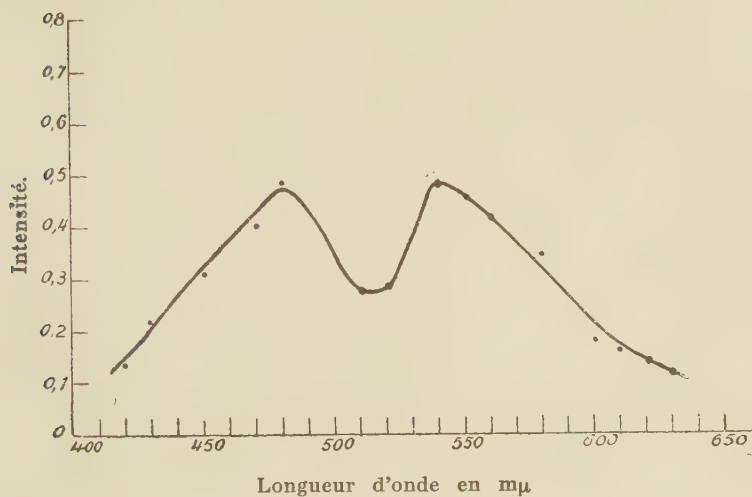


FIG. 10. — Homme ♀

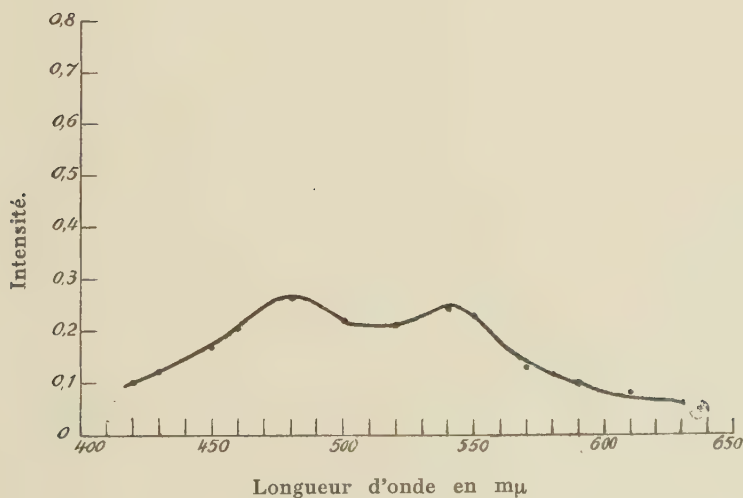


FIG. 11. — Homme ♀

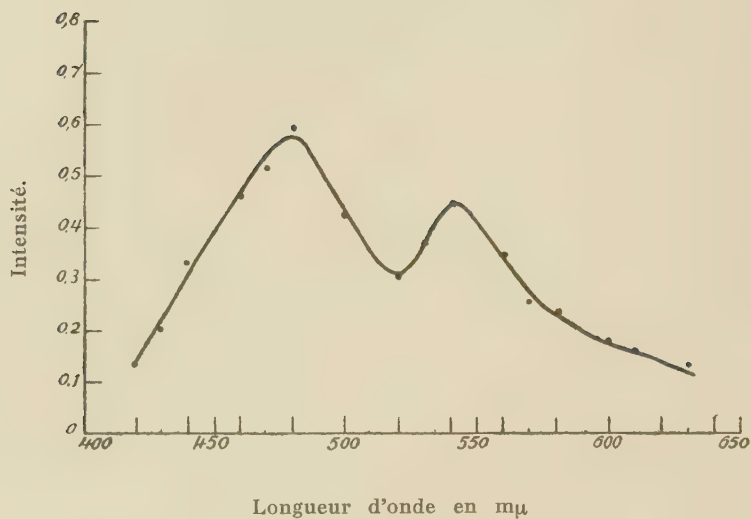


FIG. 12. — Homme ♀

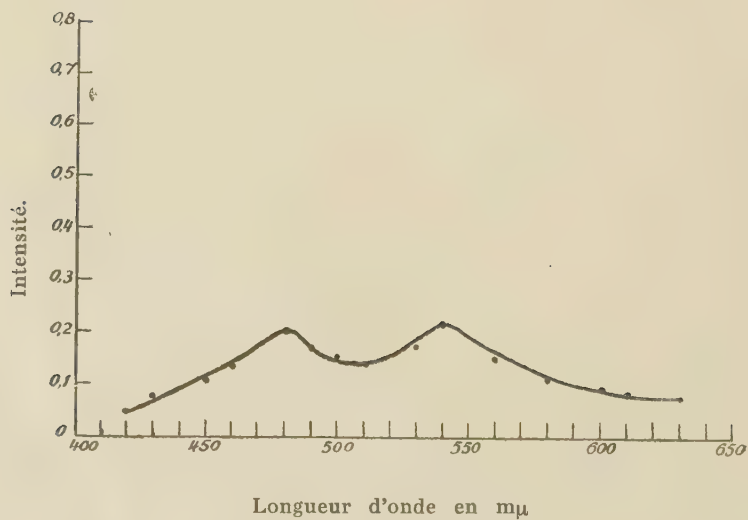
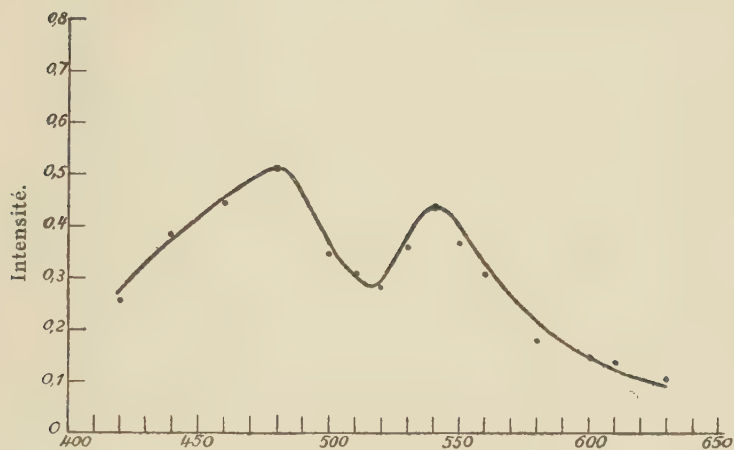
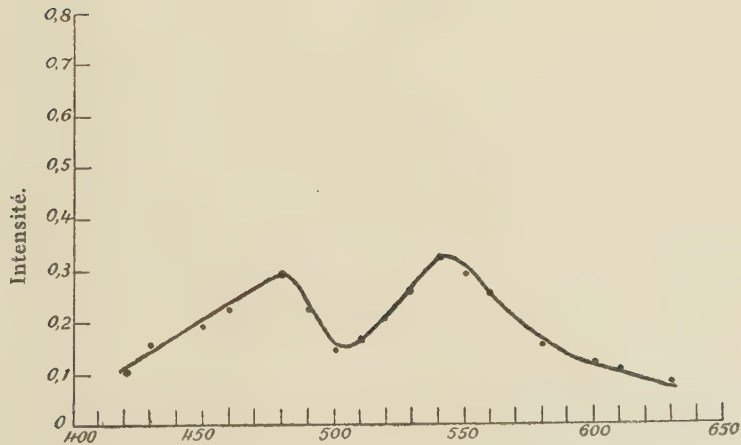


FIG. 13. — Homme ♀



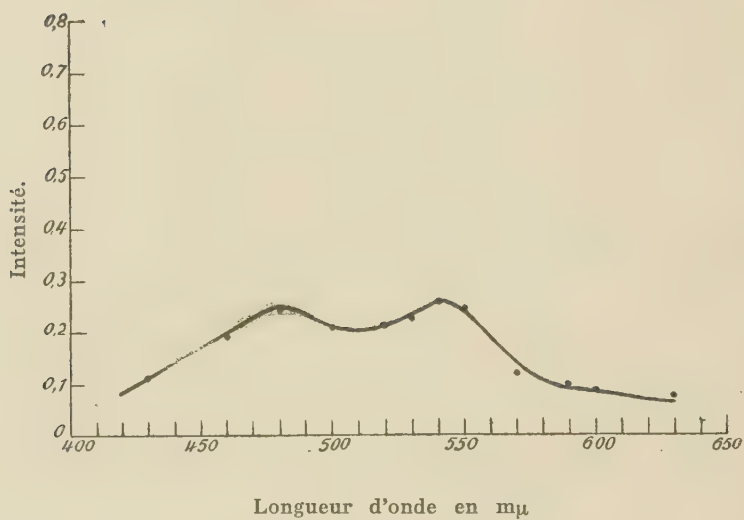
Longueur d'onde en mμ

FIG. 14. — Homme ♂



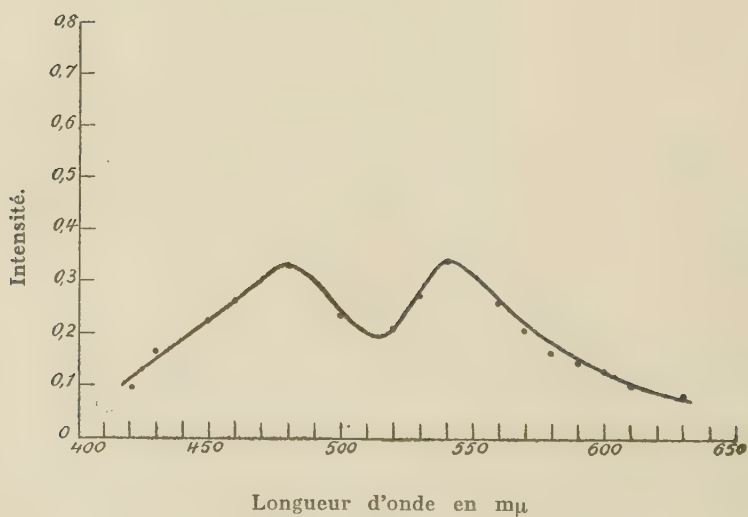
Longueur d'onde en mμ

FIG. 15. — Homme ♂



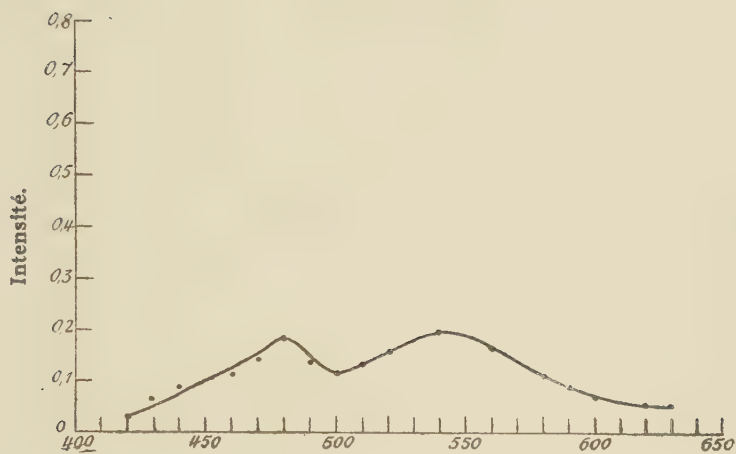
Longueur d'onde en mμ

FIG. 16. — Homme ♂



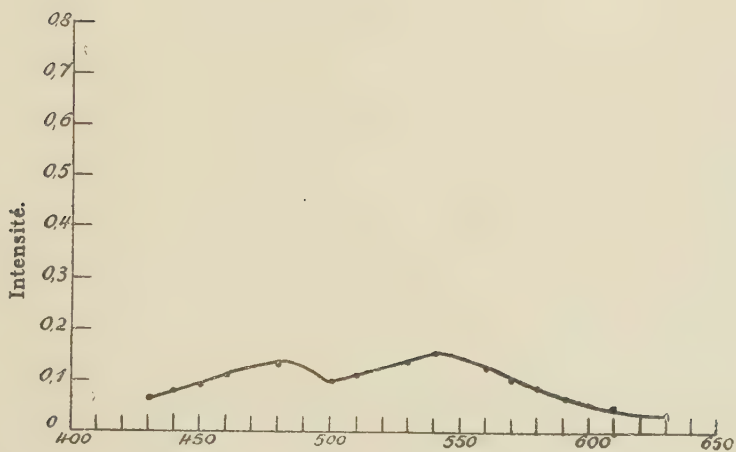
Longueur d'onde en mμ

FIG. 17. — Homme ♂



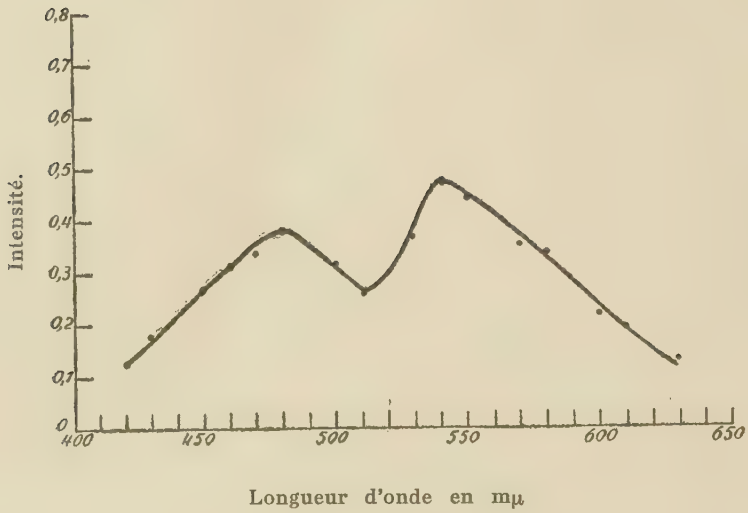
Longueur d'onde en $m\mu$

FIG. 18. — Homme ♂



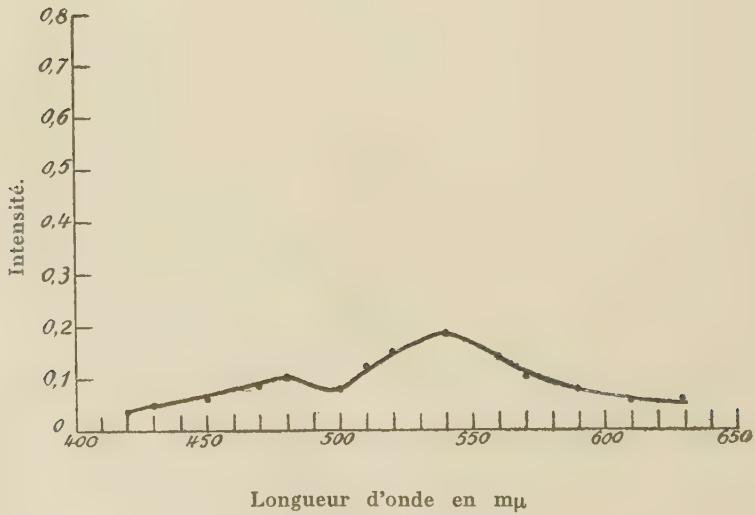
Longueur d'onde en $m\mu$

FIG. 19. — Homme ♂



Longueur d'onde en mμ

FIG. 20. — Homme ♂



Longueur d'onde en mμ

FIG. 21. — Homme ♂

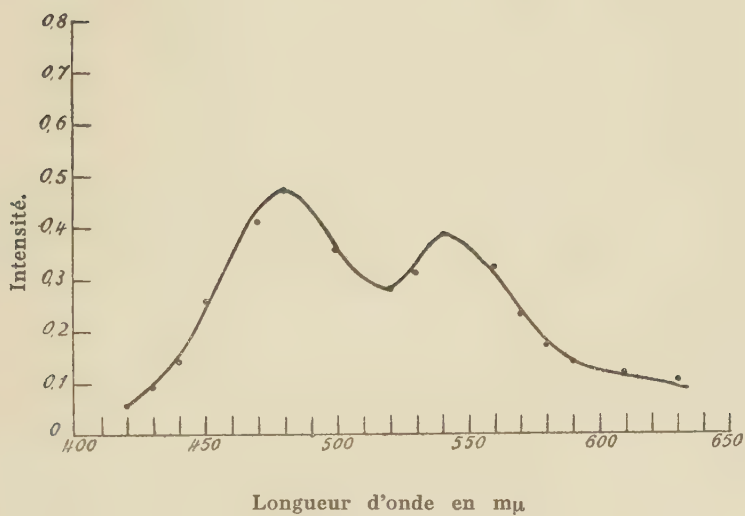


FIG. 22. — Homme ♂

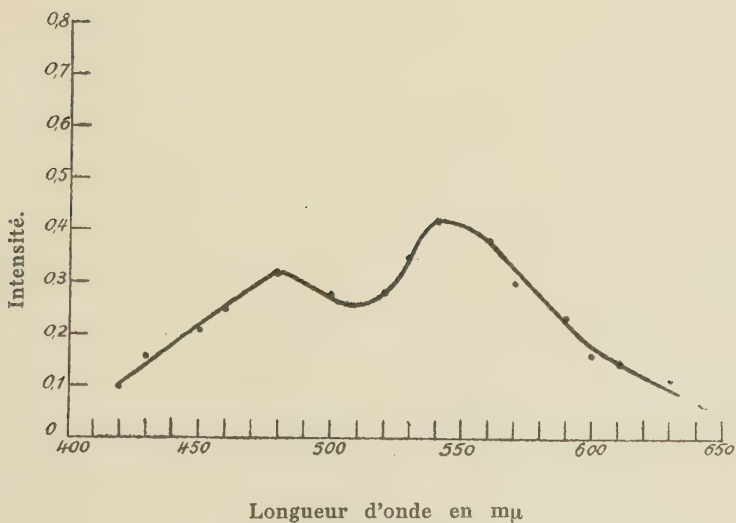


FIG. 23. — Homme ♂

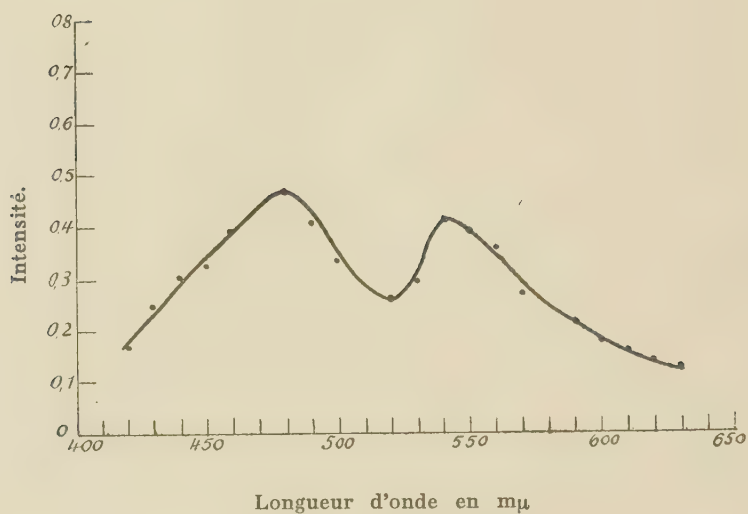


FIG. 24. — Homme ♂

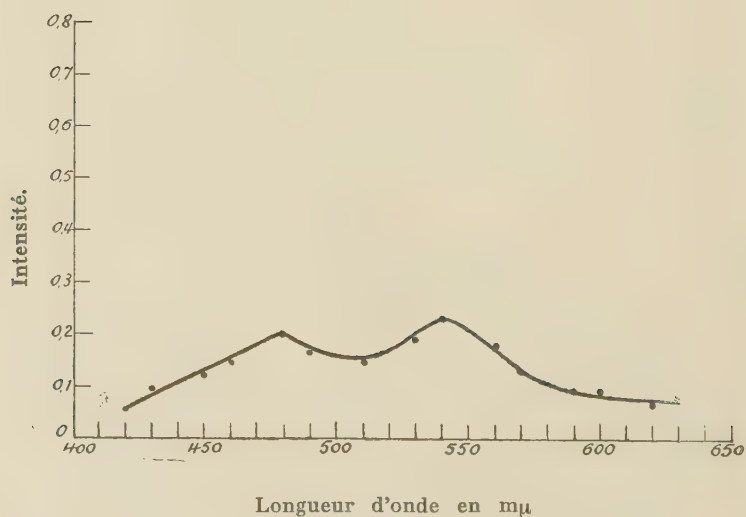
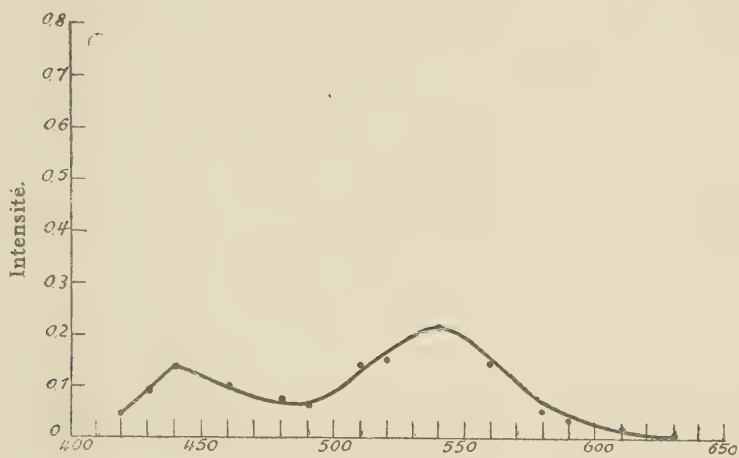
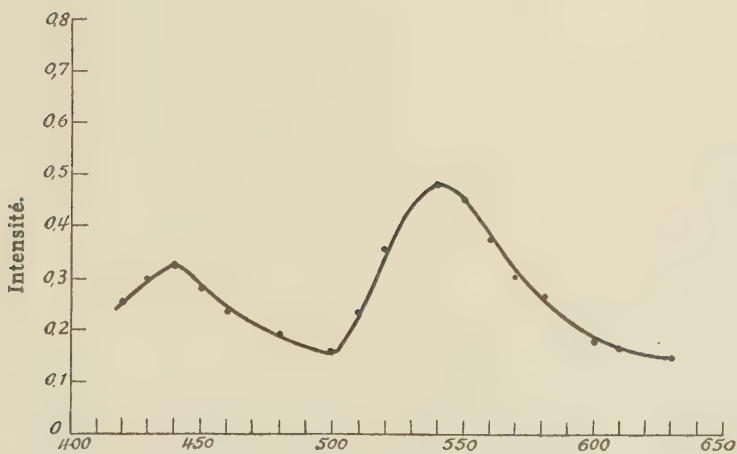


FIG. 25. — Homme ♂



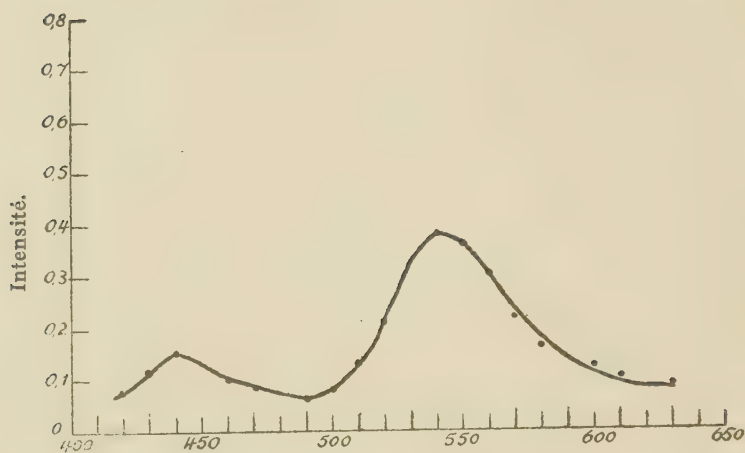
Longueur d'onde en mμ

FIG. 26. — Cheval ♀



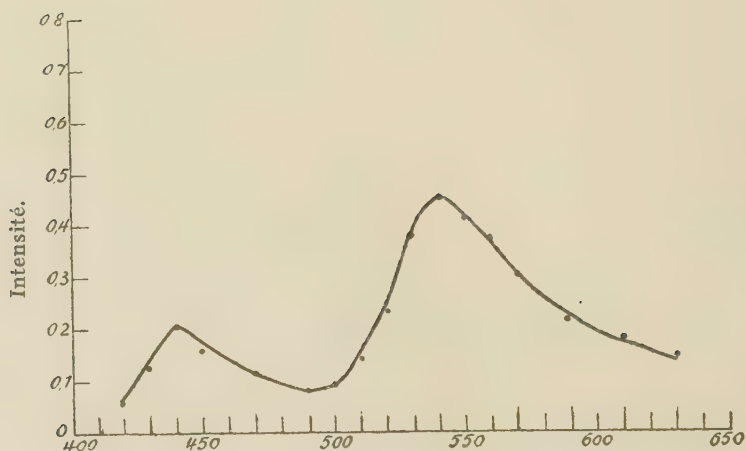
Longueur d'onde en mμ

FIG. 27. — Cheval ♂



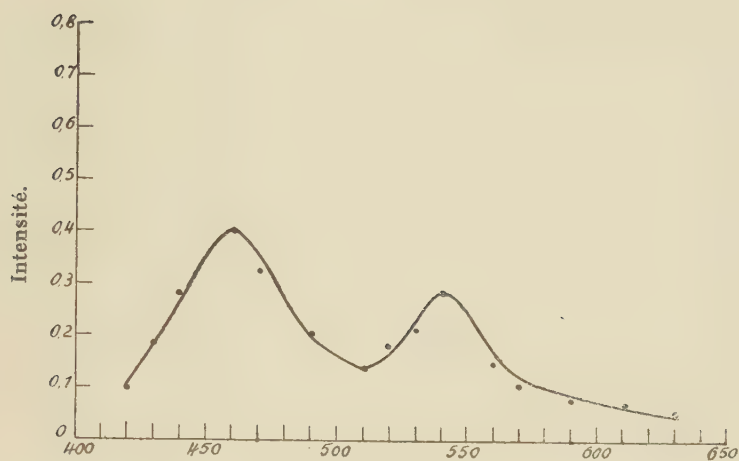
Longueur d'onde en mμ

FIG. 28. — Cheval ♂



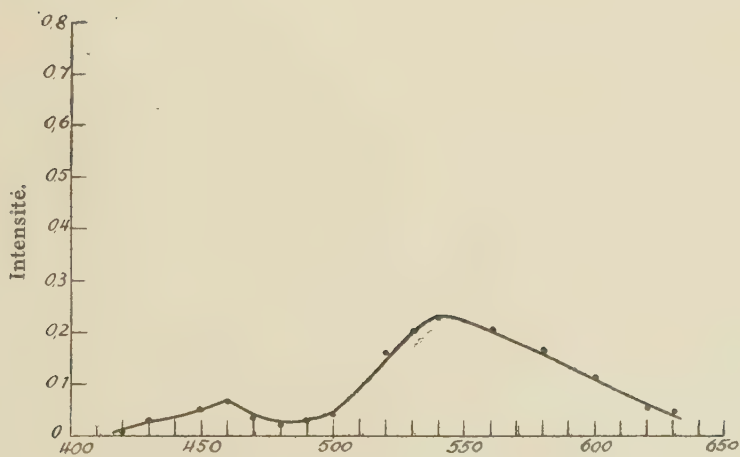
Longueur d'onde en mμ

FIG. 29. — Cheval ♂



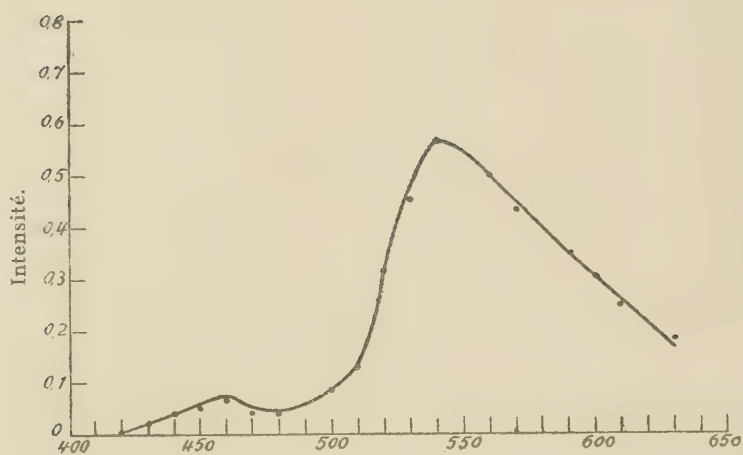
Longueur d'onde en $m\mu$

FIG. 30. — Bœuf ♀



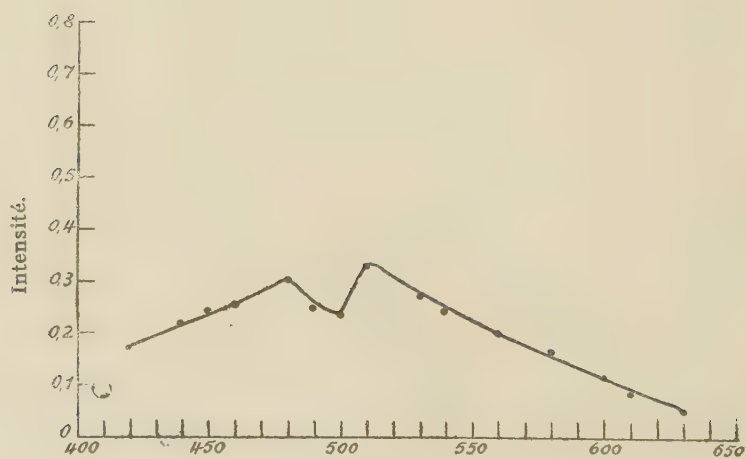
Longueur d'onde en $m\mu$

FIG. 31. — Bœuf ♀



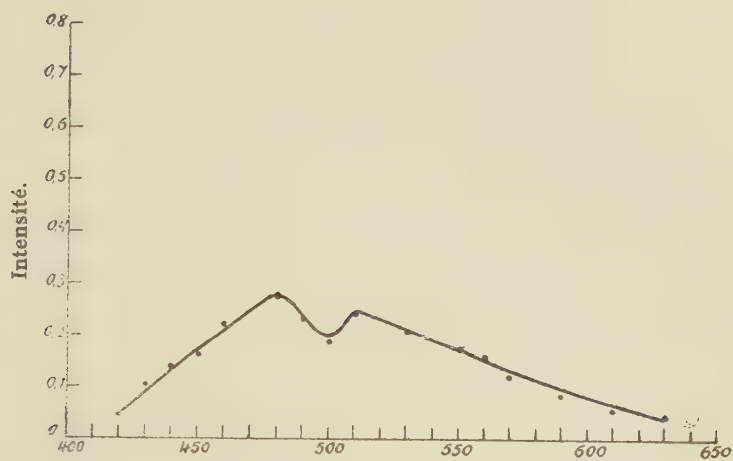
Longueur d'onde en mμ

FIG. 32. — Bœuf ♀



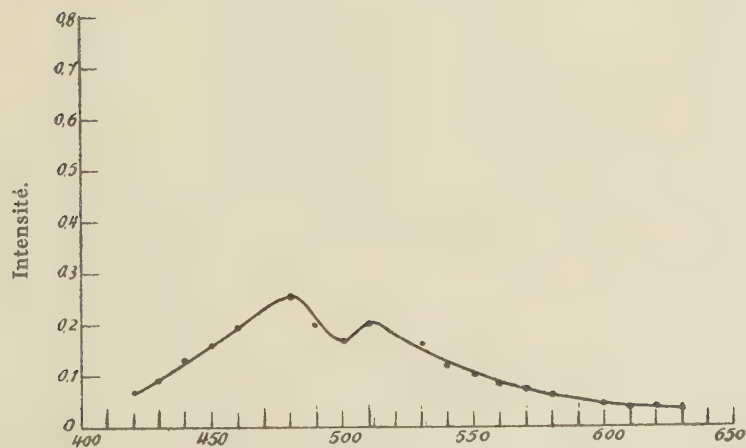
Longueur d'onde en mμ

FIG. 33. — Mouton ♀



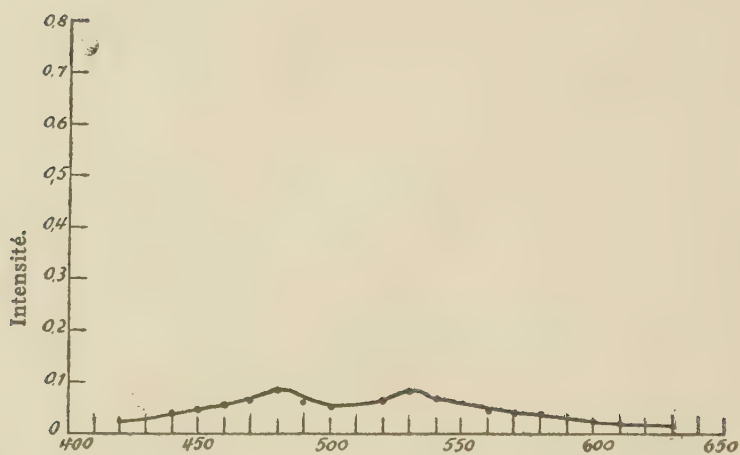
Longueur d'onde en mμ

FIG. 34. — Mouton ♂



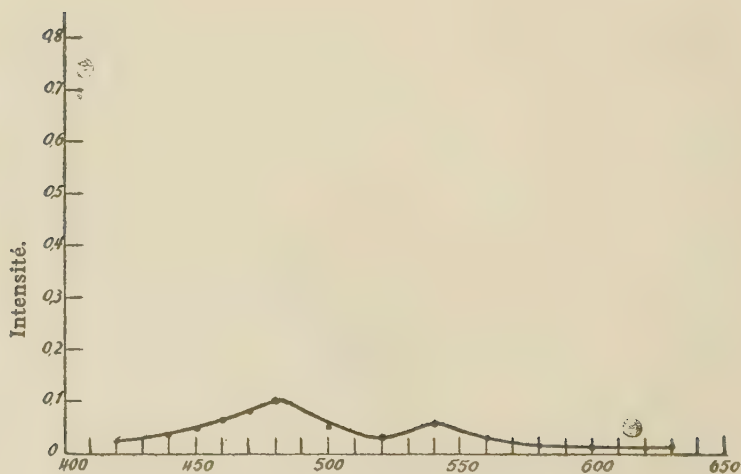
Longueur d'onde en mμ

FIG. 35. — Mouton ♂



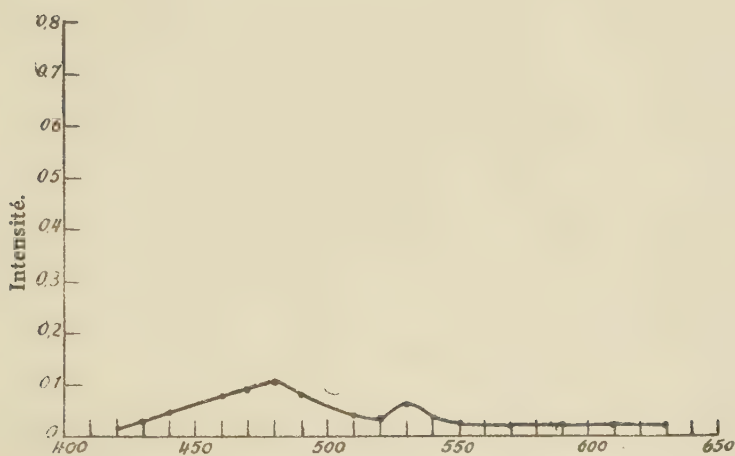
Longueur d'onde en mμ

FIG. 36. — Chèvre ♂



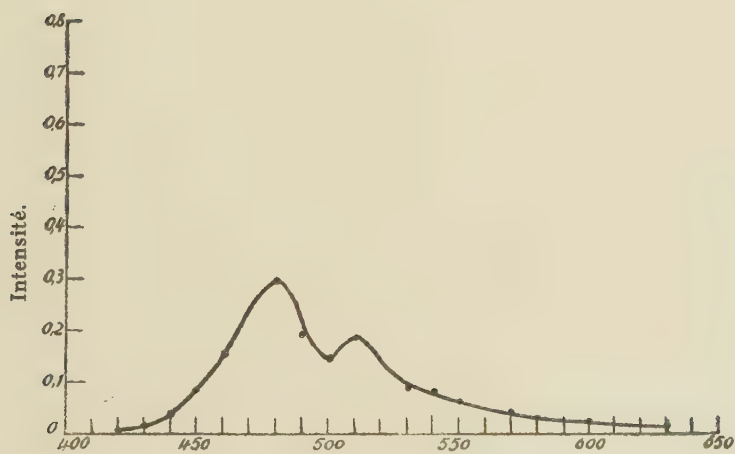
Longueur d'onde en mμ

FIG. 37. — Chèvre ♂



Longueur d'onde en mμ

FIG. 38. — Chèvre ♀



Longueur d'onde en mμ

FIG. 39. — Porc ♀

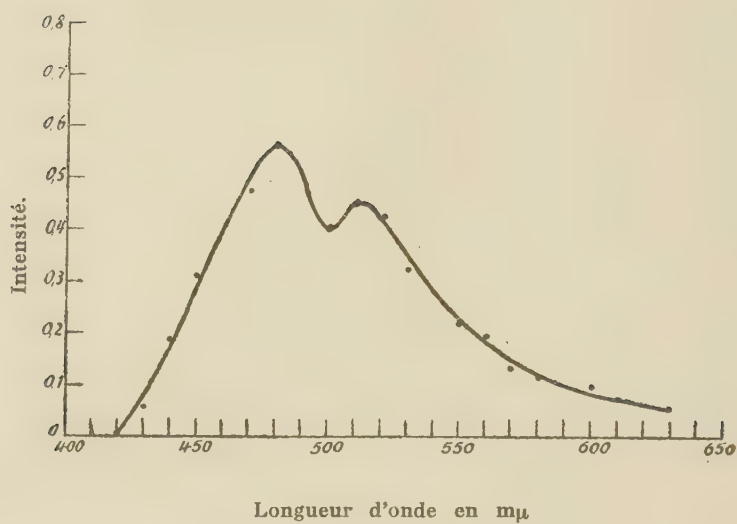


FIG. 40. — Porc σ

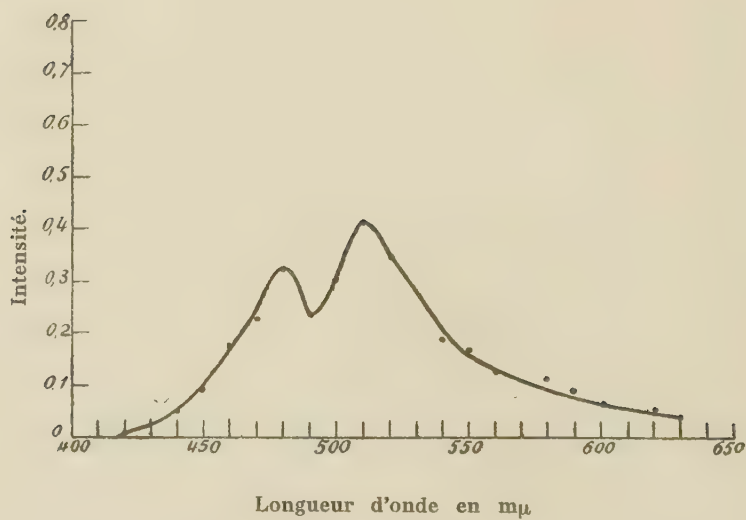
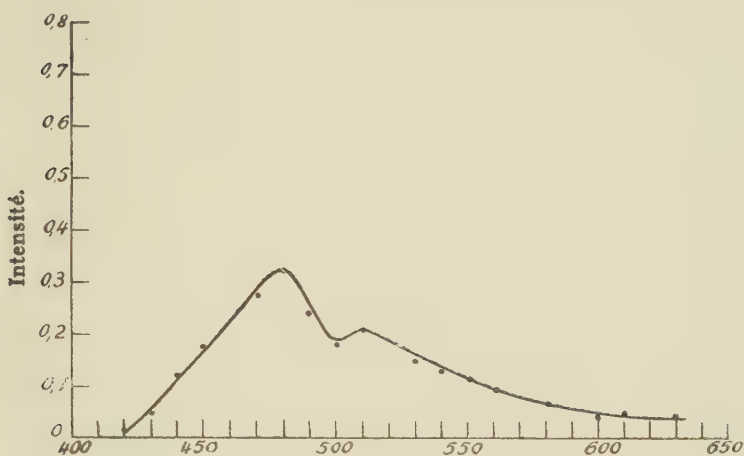
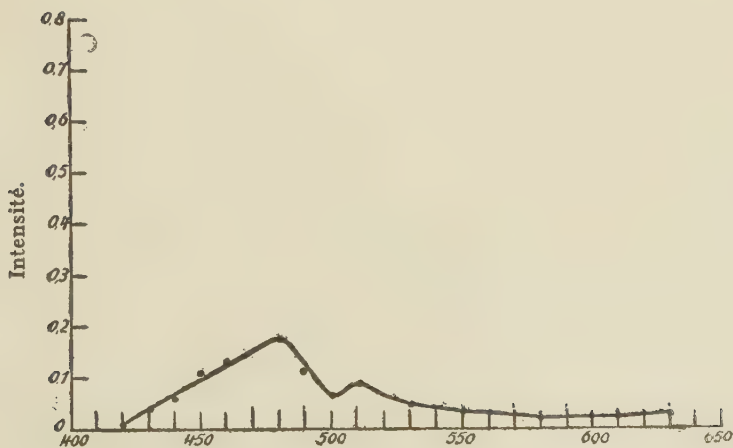


FIG. 41. — Porc σ



Longueur d'onde en $m\mu$

FIG. 42. — Lapin ♀



Longueur d'onde en $m\mu$

FIG. 43. — Lapin ♀

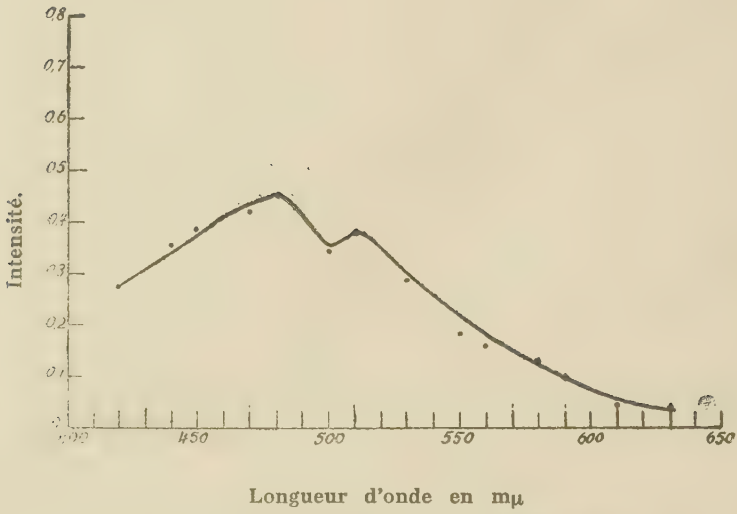


FIG. 44. — Lapin σ

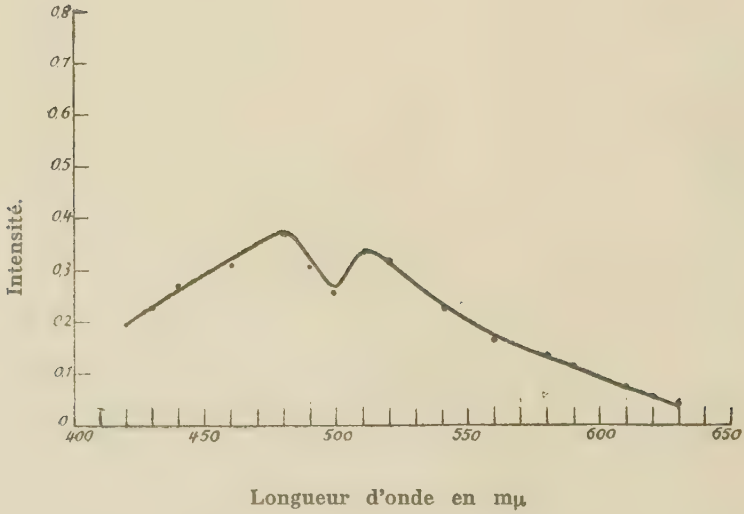


FIG. 45. — Lapin σ

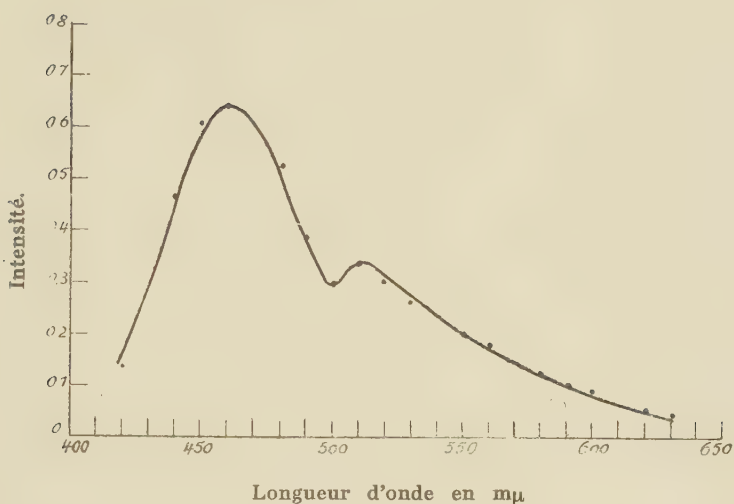


FIG. 46. — Lapin ♀

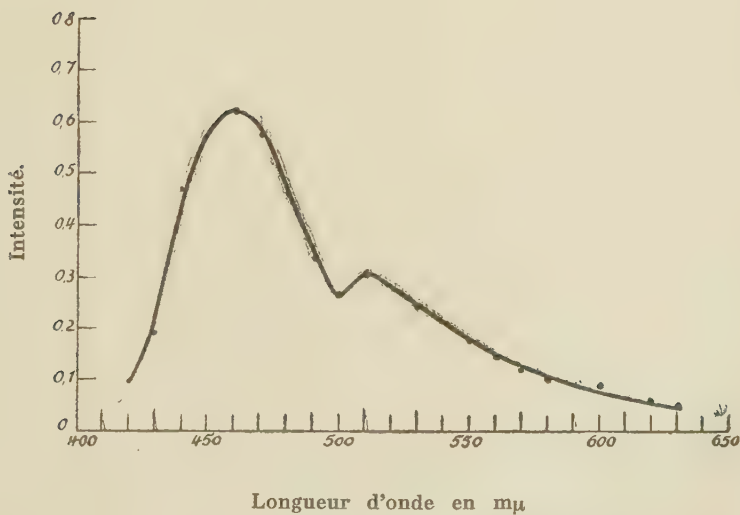
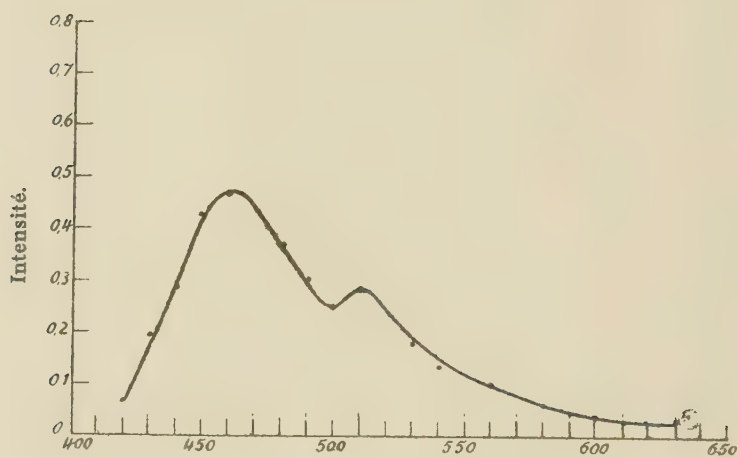


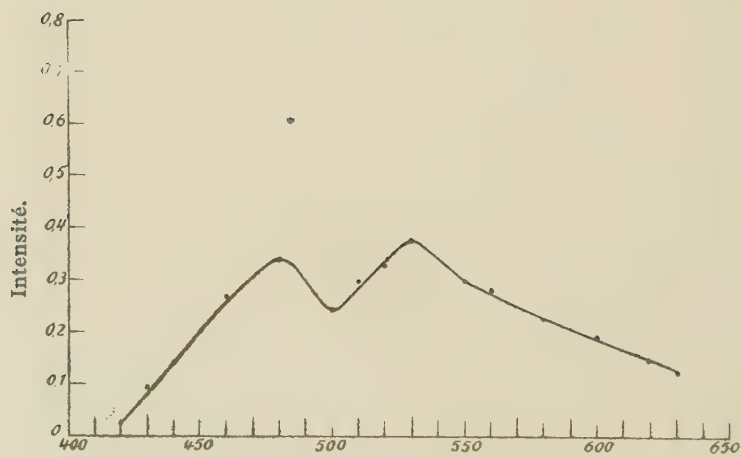
FIG. 46 bis. — Lapin ♂

Même sérum que le précédent (fig. 46), mais courbe obtenue après 10 heures d'exposition au rayonnement ultra-violet.



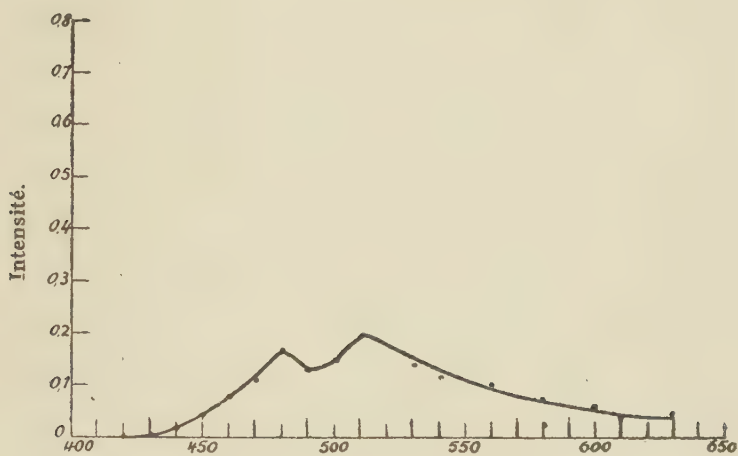
Longueur d'onde en mμ

FIG. 47. — Lapin ♂



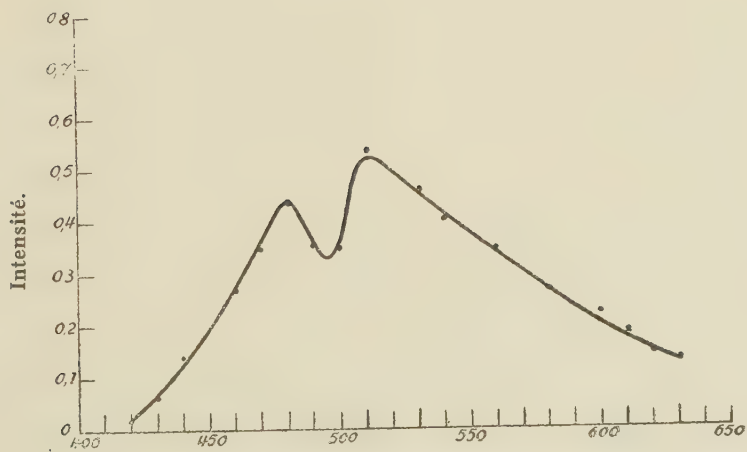
Longueur d'onde en mμ

FIG. 48. — Cobaye ♀



Longueur d'onde en mμ

FIG. 49. — Cobaye ♀



Longueur d'onde en mμ

FIG. 50. — Cobaye ♀

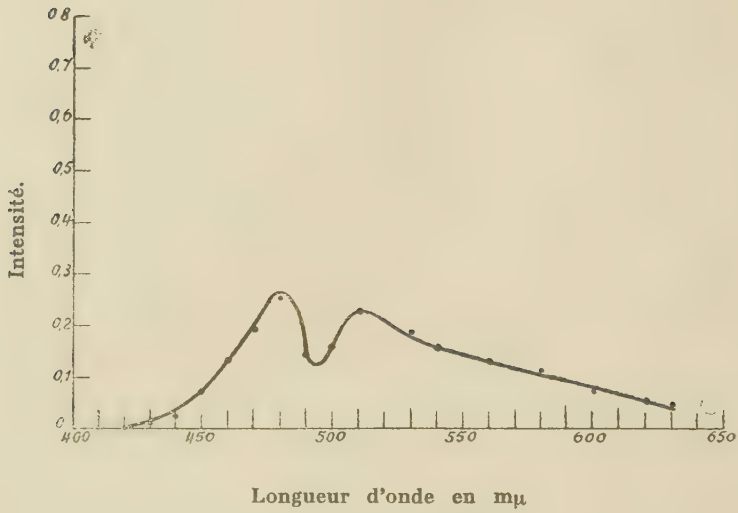


FIG. 51. — Cobaye ♂

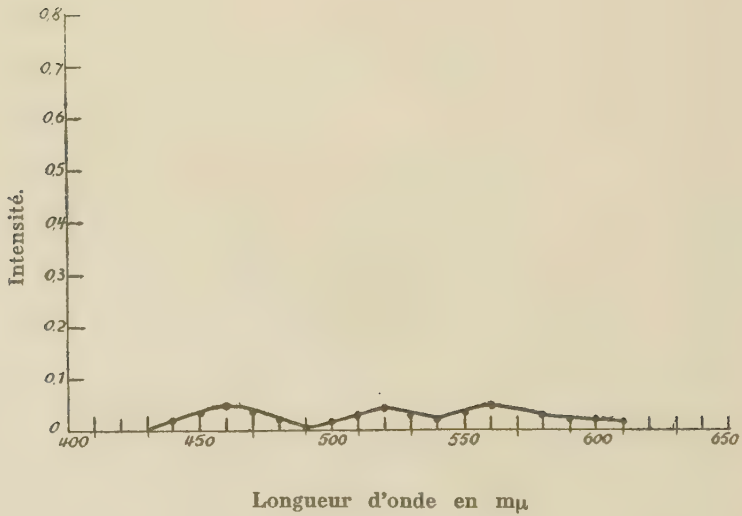


FIG. 52. — Coq ♂

CONCLUSIONS

En biologie et en médecine, de nombreux travaux ont été effectués sur la fluorescence de divers produits de l'organisme; la lumière émise par la fluorescence a été observée jusqu'à présent soit à l'œil nu, soit à l'aide de spectrographes.

Il est évident que la simple observation à l'œil nu n'est pas indiquée pour l'étude des phénomènes de fluorescence, du fait que de nombreux produits de l'organisme, excités par des radiations ultraviolettes, émettent des lumières de fluorescence impossibles à identifier ou à distinguer nettement les unes des autres, en raison de leur teinte bleuâtre commune. D'ailleurs, des rayonnements de composés spectraux très différents peuvent donner la même sensation visuelle au point de vue de l'intensité et de la coloration.

Les auteurs qui ont examiné des fluorescences par la méthode spectrographique, ne semblent pas avoir tenu compte des variations de la sensibilité des plaques photographiques suivant les longueurs d'onde. Il est impossible d'évaluer, sur le cliché, l'intensité spectrale d'émission de la fluorescence, sans la comparer avec une source lumineuse, dont la courbe spectrale d'énergie est connue. En réalité, c'est seule-

ment la spectrophotométrie que l'on doit utiliser dans l'étude des phénomènes de luminescence, car elle seule permet de mesurer à la fois l'intensité correspondant à chaque longueur d'onde et l'intensité énergétique totale; le tracé d'une courbe spectrale de l'intensité énergétique définit complètement le rayonnement étudié.

La fluorescence des sérums a été déjà signalée par divers auteurs, mais aucun n'a encore employé la méthode spectrophotométrique pour étudier la lumière émise. Il est certain que la très faible intensité de la lumière de fluorescence des sérums rend extrêmement difficile son étude spectrophotométrique.

A l'aide d'un spectrophotomètre spécialement construit en vue d'obtenir une grande luminosité, et d'une puissante source de radiation excitatrice ($\lambda = 3650 \text{ \AA}$), l'auteur a réussi le premier à étudier la répartition spectrale énergétique de la fluorescence émise par des sérums de l'Homme et de différents animaux considérés comme sains. Il a ainsi mis au point une méthode spectrophotométrique utilisable dans l'étude des lumières de très faible intensité.

Les sérums examinés provenant de l'Homme et de différents mammifères, présentent, sous le rayonnement ultraviolet, une fluorescence plus ou moins intense, dont le spectre possède deux bandes d'émission très nettes, tandis que le spectre du sérum de Coq en possède trois.

Bien que la position de l'axe de ces bandes varie

suivant l'espèce considérée, il existe des sérums qui donnent une fluorescence dont les maxima d'intensité d'émission coïncident avec ceux d'autres sérums. Cependant, on peut, jusqu'à un certain point, distinguer les unes des autres les espèces de sérum d'après la forme de la courbe spectrale de fluorescence.

Le type de la courbe spectrale énergétique de la fluorescence est caractéristique chez certains animaux (Cheval, Bœuf, Chèvre, Lapin, Coq).

L'intensité énergétique totale de la fluorescence émise par le sérum de la même espèce dépend de l'individu, mais la position de l'axe des bandes ne change pas, sauf pour quelques échantillons supposés pathologiques.

Dans les conditions des présentes expériences, la courbe spectrale énergétique de la fluorescence n'est pas modifiée par l'exposition des sérums à l'action du rayonnement ultraviolet.

On sait que diverses maladies, telles que le diabète, l'ictère, etc., font apparaître dans le sang des composants anormaux. Il est évident que, dans les maladies modifiant l'état colloïdal ainsi que la composition du sang, la fluorescence du sérum, particulièrement la courbe spectrale d'énergie de cette fluorescence, ne reste pas inchangée. Il paraît donc possible d'établir une nouvelle méthode physique de diagnostic basée sur la spectrophotométrie de la fluorescence. Si, dans certaines maladies, l'intensité de la fluorescence est trop faible pour la mesure spec-

trophotométrique, on peut avoir recours à des réactifs chimiques appropriés afin d'intensifier l'émission de la lumière.

Ayant uniquement examiné, dans sa présente étude, des sérums normaux, l'auteur est persuadé que les courbes spectrales obtenues peuvent servir de base à des recherches ultérieures qui seront effectuées sur des sérums provenant de sujets atteints de maladies diverses. Tous les résultats de ces recherches permettraient d'établir une nouvelle sérologie spectrophotométrique. Grâce à cette sérologie, il serait possible de porter, avec précision et d'une façon précoce, le diagnostic et de suivre l'évolution de la maladie sous traitement.

La technique que l'auteur a développée dans son présent travail, peut rendre en biologie et en médecine de grands services aux chercheurs qui ont besoin d'étudier avec précision les phénomènes de luminescence de très faible intensité.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) FR. PERRIN. — La fluorescence des solutions. *Ann. de Physique*, t. 12, p. 169 (1929).
- (2) FR. PERRIN. — Fluorescence, durée élémentaire d'émission lumineuse. *Conférences d'actualités scientifiques et industrielles*, N° 22, Hermann et Cie, Paris (1931).
- (3) G. BRUHAT. — Cours d'optique, p. 720. *Masson et Cie, Paris* (1931).
- (4) J. T. HEWITT. — Ueber die Beziehung zwischen der Konstitution und der Fluoreszenz einiger Substanzen. *Zeitschrift für physikalische Chemie*, Band 34 S. 1 (1900).
- (5) P. PRINGSHEIM. — Fluoreszenz und Phosphoreszenz im Lichte der neueren Atomtheorie, *Julius Springer, Berlin*, 3. Auflage (1928).
- (6) M. CURIE. — Luminescence des corps solides, *Presses Universitaires de France, Paris* (1934).
- (7) R. W. WOOD. — Communications secrètes au moyen de rayons lumineux. *Journal de Physique*, 5^e série, t. 9, p. 77 (1919).
- (8) CH. DHÉRE. — L'étude spectroscopique et spectrographique des fluorescences biologiques. *Ann. de physiol. et physicochim. biol.*, t. 8, p. 760 (1932).
- (9) CH. DHÉRE. — Nachweis der biologisch wichtigen Körper durch Fluoreszenz und Fluoreszenzspektren. *Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*, 420. Lieferung (1933).

- (10) CH. DÉRÉ. — La fluorescence en biochimie. Problèmes biologiques, N° 21, *Presses Universitaires de France*, Paris (1937).
- (11) SHOKON KAKOU. — Spectroscopical study on the reflection of visible rays from human skin in situ; an analysis of the skin colour of the yellow race by spectrophotometric method. *National Hygiène*, Vol. IX, p. 1608 (1932).
- (12) H. STÜBEL. — Die Fluoreszenz tierischer Gewebe in ultraviolettem Licht. *Pflügers Archiv für die ges. Physiologie*, Band. 142 S. 1 (1911).
- (13) E. DERRIEN. — Note préliminaire sur quelques faits nouveaux pour l'histoire naturelle des porphyrines animales. *C. R. de la Soc. de biol.*, t. 91, p. 634 (1924) et *Bull. de la Soc. Chim. de France*, 4^e série, t. 35, p. 687 (1924).
- (14) E. DERRIEN et J. TURCHINI. — Sur l'accumulation d'une porphyrine dans la glande de Harder des rongeurs du genre *Mus* et sur son mode d'excrétion. *C. R. de la Soc. de biol.*, t. 91, p. 637 (1924).
- (15) F. VLÈS et A. UGO. — Sur l'excitation de la fluorescence du cholestérol et de la peau. *C. R. de la Soc. de biol.*, t. 123, p. 226 (1936).
- (16) O. GERNGROSS und M. SCHULZ. — Ueber die Fluoreszenz der Kuhmilch im filtrierten Ultraviolett-Licht. *Chemiker Zeitung*, 51. Jahrgang, S. 501 (1927).
- (17) J. SPOLVERINI. — La fluorescenza del latte. *Riv. italiana di Actinologia*, t. 2, p. 1 (1927).
- (18) R. JOACHIMOVITS. — Nachweis von Medikamenten und Giften in Muttermilch und Fruchtwasser mittelst Lumineszenz-Analyse. *Monatschr. f. Geburtshilfe und Gynäkologie*, 83, S. 42 (1929).
- (19) H. W. KINNERSLEY, R. A. PETERS and B. T. SQUI-

- RES. — Animal quinoïdine. *Biochemical Journal*, Vol. 19, p. 404 (1925).
- (20) B. T. SQUIRES. — The ultra-violet fluorescence of urine. *Journal of Physiology*, Vol. 66, Proceedings, p. 14 (1928).
- (21) A. HADJIOLOFF et T. KRESTEFF. — Examen à la lumière de Wood des urines de l'Homme et des vertébrés. *C. R. de la Soc. de biol.*, t. 106, p. 662 (1931).
- (22) Y. YONEYAMA. — Ueber Luminescenzanalyse des Harnes. *Zeitschrift für die gesammte experimentelle Medizin*. Band 76. S. 680 (1931).
- (23) G. HOLLAND und A. SCHÜRMEYER. — Beitrag zur Klinik der Porphyrrie und Hinweis auf eine einfache Nachweismethode des Porphyrins im Urin. *Klinische Wochenschrift*, 11. Jahrgang, S. 1221 (1932).
- (24) P. NIEDERHOFF und G. HOLLAND. — Ueber eine durch Fluorescenzlicht nachweisbare Substanz im menschlichen Harn. *Klinische Wochenschrift*, 12 Jahrgang, S. 1184 (1933).
- (25) W. F. WASSINK. — Glanzende urine. *Nederlandsch Tijdschrift voor Geneeskunde*, 77. Jaargang, p. 4035 (1933).
- (26) K. VON DEM BORNE. — Blauwe fluorescentie van urine. *Nederlandsch Tijdschrift voor Geneeskunde*, 80. Jaargang, p. 714 (1936).
- (27) R. HELLER. — Eine neue optische Methode zur Auffindung von Spermaspuren. *Vierteljschr. f. Gerichtl. Med.*, 50, S. 37 (1915).
- (28) C. SIMONIN. — La valeur médico-légale de l'examen des taches de sperme à la lumière de Wood. *Ann. de Méd. lég.*, t. 9, p. 60 (1929).
- (29) M. BORNAND et G. BONIFAZI. — L'identification des taches de sperme. *Pharm. Acta Helv.*, 8, p. 107 (1933).

- (30) P. PONTIUS et A. HUSSON. — Sur la détection de divers produits organiques, et en particulier du sperme humain, par la spectrographie de leur fluorescence en lumière de Wood. *C. R. de la Soc. de biol.*, t. 116, p. 538 (1934).
- (31) G. KÖGEL. — Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, fasc. 258, S. 1992 (1928).
- (32) R. EXNER und E. KLEMPERER. — Die Fluoreszenz des Liquor cerebrospinalis. *Psychiatrisch-neurolog. Wochenschrift*, 32, S. 218 (1930).
- (33) P. GYÖRGY und R. KUHN. — Ueber einen Farbstoff im Liquor cerebrospinalis eines Kindes, etc. *Die Naturwissenschaften*, 21. Jahrgang, S. 405 (1933).
- (34) F. PLAUT, K. BOSSERT und M. BÜLOW. — Ueber Fluoreszenzerscheinungen im Liquor cerebrospinalis. *Klinische Wochenschrift*, 13. Jahrgang, S. 1455 (1934).
- (35) CH. J. KELLER und H. SCHOEN. — Fluoreszenzuntersuchungen am Eintrocknungsbild des menschlichen Liquor cerebrospinalis. *Klinische Wochenschrift*, 14. Jahrgang, S. 817 (1935).
- (36) H. PUBOR. — Fluoreszenz-Serologie. *Fortschritte der Medizin*, 51. Jahrgang, S. 695 (1933).
- (37) BROcq-ROUSSEU. — La fluorescence des sérums. *Progrès Médical*, p. 529 (1935).
- (38) P. COURMONT et TH. NOGIER. — Les sérums vus à la lumière de Wood. *Lyon Médical*, t. CXXXV, N° 24, p. 735 (1925).
- (39) M. CHAMPEIL. — La lumière de Wood. *Thèse (Méd.)*, Alger (1925).
- (40) P. WELS. — Der Einfluss kurzweiliger Strahlen auf die Fluoreszenz von Eiweisskörpern und ihren Spaltprodukten. *Pflügers Archiv für die ges. Physiologie*, Band 219, S. 738 (1928).

- (41) P. WELS. — Der Einfluss der Quarzlampenstrahlung auf die Fluoreszenz von Geweben und Zellen. *Pflügers Archiv für die ges. Physiologie*, Band 223, S. 369 (1930).
- (42) S. STERLING-OKUNIEWSKI et Z. PENSKA. — La fluorescence des sérums. *C. R. de la Soc. de biol.*, t. 107, p. 289 (1931).
- (43) P. F. LENSCHOW. — Untersuchung von Serum, Sekreten und Exkreten des Pferdes im filtrierten ultravioletten Licht. *Diss. Hannover* (1931).
- (44) O. RECHE. — Fluoreszenzdiagnose. *Münchener Medizinische Wochenschrift*, 78. Jahrgang, S. 1591 (1931).
- (45) O. RECHE. — Fluoreszenzerscheinungen bei Blutseren. *Zeitschrift für Rassenphysiologie*, Band 4, S. 97 (1931).
- (46) O. RECHE. — La fluorescencia aplicada a la serologia. *Revista medica germano-ibero-americana*, t. 5, p. 68 (1932).
- (47) O. RECHE. — Neues zur Entdeckung von Fluoreszenzerscheinungen bei Blutseren. *Radiologica (Venezia)*, t. 1, p. 3 (1933).
- (48) W. BUCHLOH. — Fluoreszenzmessungen an gesunden menschlichen Blutseren. *Zeitschrift für Rassenphysiologie*, Band 6, S. 166 (1933).
- (49) O. RECHE und J. SCHILLING. — Weitere Untersuchungen über Fluoreszenzerscheinungen an gesunden menschlichen Blutseren. *Zeitschrift für Rassenphysiologie* Band 6, S. 170 (1933).
- (50) F. VLÈS. — Sur les conditions d'excitation de la fluorescence des protides. *C. R. de l'Acad. des Sciences*, t. 202, p. 2184 (1936).
- (51) H. BUISSON et CH. FABRY. — Les lois du noircissement des plaques photographiques. *Revue d'Optique*, t. 3, p. 1 (1924).

- (52) E. THÜRMEL. --- Das Lummer-Pringsheimsche Spektral-Flickerphotometer als optisches Pyrometer. *Annalen der Physik*, Band 33, S. 1139 (1910).
- (53) H. E. IVES. — Studies in the photometry of lights of different colours. *Philosophical Magazine*, Vol. 24, pp. 149, 352, 744, 845, 853 (1912).
- (54) W. W. COBLENTZ and W. B. EMERSON. — Relative sensibility of the average eye to light of different colors and some practical applications to radiation problems. *Scientific Papers of the Bureau of Standards*, N° 303 (1917).
- (55) K. S. GIBSON and E. P. T. TYNDALL. — Visibility of radiant energy. *Scientific Papers of the Bureau of Standards*, N° 475 (1923).
- (56) A. ROSENSTIEHL. — Traité de la couleur, *Editions de Dunod*, p. 17 (1934).
- (57) P. W. DANCKWORTT. — Lumineszenz-Analyse im filtrierten ultravioletten Licht. *Akademische Verlagsanstalt, Leipzig* (1929).
- (58) H. BIERRY et B. GOUZON. — Caractérisation des taches de sang par réaction spectrale. *Bull. de l'Acad. de Méd.*, 3^e série, t. 107, p. 635 (1932).
- (59) W. BRUNNER. — Die klinische Bedeutung der grünen Fluoreszenz im Blutserum. *Klinische Wochenschrift*, 14. Jahrgang S. 121 (1935).
- (60) A. A. HIJMAN VAN DEN BERGH, und W. GROTEPASS. — Porphyrinämie ohne Porphyrinurie. *Klinische Wochenschrift*, 12. Jahrgang S. 586 (1933).
- (61) E. VIGLIANI und CL. ANGELERI. — Ueber das im Plasma Bleikranker vorkommende Porphyrin. *Klinische Wochenschrift*, 15. Jahrgang. S. 700 (1936).

- (62) Ch. ACHARD, A. BOUTARIC et J. BOUCHARD. — Action des sérums sur le pouvoir fluorescent des solutions d'uranine. *R. C. de l'Acad. des Sciences*, t. 199, p. 903 (1934).
- (63) A. BOUTARIC et J. BOUCHARD. — Action de quelques liquides normaux ou pathologiques et de quelques produits thérapeutiques sur la fluorescence des solutions d'uranine. *C. R. de la Soc. de biol.*, t. 118, p. 1.188 (1935).
- (64) A. BOUTARIC et J. BOUCHARD. — Action du sérum de souris porteuses de cancer au goudron sur le pouvoir fluorescent des solutions d'uranine. *C. R. de la Soc. de biol.*, t. 120, p. 293 (1935).
- (65) A. BOUTARIC. — Une nouvelle méthode d'investigation clinique basée sur la fluorescence. *Presse Médicale*, N° 41, p. 817 (1935).
- (66) J. Th. BRUGSCH. — Die Bedeutung des qualitativen Porphyrinnachweises im Blutserum. *Münchener Medizinische Wochenschrift*, 82. Jahrgang. S. 1803 (1935).
- (67) Ch. FABRY. — Le corps noir, étalon photométrique. Les difficultés dans la réalisation de l'étalon photométrique primaire. *Réunions de l'Institut d'Optique*, 3^e année, 5^e réunion, p. 72 (1932).
- (68) Ch. FABRY. — Introduction générale à la photométrie. *Editions de la Revue d'Optique*, p. 149 (1927).
- (69) G. RIBAUD. — Traité de pyrométrie optique. *Editions de la Revue d'Optique*, p. 231, p. 407 (1931).
- (70) G. BRUHAT. — Traité de polarimétrie. *Editions de la Revue d'Optique*, p. 39 (1930).
- (71) Ch. FABRY et H. BUISSON. — L'absorption de l'ultra-violet par l'ozone et la limite du spectre solaire. *Journal de Physique*, t. 3, p. 196 (1913).

- (72) J. K. ROBERTSON. — Intensity measurements of spectral lines. *Journal of the Optical Society of America*, Vol. 7, p. 983 (1923).
- (73) W. R. HAM, R. B. FEHR and R. E. BITNER. — A photographic null method for measuring absorption in the ultra-violet. *Journal of the Franklin Institute*. Vol. 178, p. 299 (1914).
- (74) G. R. HARRISON and C. E. HESTHAL. — Photographic photometry in the ultra-violet. *Journal of the Optical Society of America*, Vol. 8, p. 471 (1924).
- (75) G. R. HARRISON. — On the elimination of errors when wire screens are used as neutral filters for photographic photometry. *Journal of the Optical Society of America*, Vol. 18, p. 492 (1929).
- (76) H. BUISSON et Ch. FABRY. — Sur un microphotomètre destiné à la mesure de l'opacité des plaques photographiques. *C. R. de l'Acad. des Sciences*, t. 156, p. 389 (1913).
- (77) Ch. FABRY et H. BUISSON. — Description et emploi d'un nouveau microphotomètre. *Journal de Physique*, 5^e série, t. 9, p. 37 (1919).
- (78) P. LAMBERT et D. CHALONGE. — Microphotomètre enregistreur à cellule photoélectrique. *Revue d'Optique*, t. 5, p. 404 (1926) et t. 10, p. 405 (1931).
- (79) W. J. H. MOLL. — A new registering microphotometer. *Proc. of the Physic. Soc. of London*, Vol. 33, p. 207 (1921).
- (80) E. BRODHUN. — Rotierender Sektor, dessen Winkel während der Rotation verändert und abgelesen werden kann. *Zeitschrift für Instrumentenkunde*, XXIV. Jahrgang. S. 313 (1904).
- (81) A. JOBIN et G. YVON. — Le spectrophotomètre Yvon. — *Revue d'Optique*, t. 1, p. 499 (1922).

- (82) G. RIBAUD. — Traité de pyrométrie optique. *Editions de la Revue d'Optique*, p. 341, p. 349 (1931).
- (83) M. PLANCK. — Entropie und Temperatur strahlender Wärme. *Annalen der Physik, Band 1*. S. 719 (1900).
- (84) H. E. IVES. — The luminous properties of the black body. *Journal of the Optical Society of America*, Vol. 12, p. 75 (1926).
- (85) *International Critical Tables*, Vol. 1, p. 18 (1926) and Vol. 5, p. 238 (1929).
- (86) M. PLANCK. — Ueber das Gesetz der Energieverteilung im Normalspectrum. *Annalen der Physik, Band 4*, S. 553 (1901).
- (87) J. H. JEANS. — On Non-Newtonian mechanical systems and Planck's theory of radiation. *Philosophical Magazine*, Vol. 20, p. 943 (1910).
- (88) A. EINSTEIN. — Zur Quantentheorie der Strahlung. *Physikalische Zeitschrift*, 18. Jahrgang S. 121 (1917).
- (89) H. RUBENS und F. KURLBAUM. — Anwendung der Methode der Reststrahlen zur Prüfung des Strahlungsgesetzes. *Annalen der Physik, Band 4*, S. 649 (1901).
- (90) W. W. COBLENTZ. — Constants of spectral radiation of a uniformly heated inclosure or so-called black body. *Bulletin of the Bureau of Standards*, Vol. 13, p. 459 (1916).
- (91) W. WIEN. — Ueber die Energieverteilung im Emissionsspectrum eines schwarzen Körpers. *Wiedemanns Annalen, Band 58*, S. 662 (1896).
- (92) Ch. FABRY. — Introduction générale à la photométrie. *Editions de la Revue d'Optique*, p. 121, p. 129 (1927).
- (93) W. E. FORSYTHE. — Report on pyrometry.

- Journal of the Optical Society of America*, Vol. 4, p. 331 (1920).
- (94) L. T. TROLAND. — Report on colorimetry. *Journal of the Optical Society of America*, Vol. 6, p. 558 (1922).
- (95) M. K. FREHAFFER and CH. L. SNOW. — Tables and graphs for facilitating computations of spectral energy distribution by Planck's formula. *Miscellaneous Publications of the Bureau of Standards*, N° 56 (1925).
- (96) J. F. SKOGLAND. — Tables of spectral energy distribution and luminosity for use in computing light transmissions and relative brightnesses from spectrophotometric data. *Miscellaneous Publications of the Bureau of Standards*, N° 86 (1929).
- (97) F. WEIGERT. — Optische Methoden der Chemie, S. 34. *Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig* (1927).
- (98) GALLOIS et Cie. — Nouvel arc à mercure en quartz à grand éclat. *Revue d'Optique*, t. 10, p. 325 (1931).
- (99) P. DAURE. — Production de l'effet Raman transversal par les radiations violettes de l'arc au mercure. *Réunions de l'Institut d'Optique*, 3^e réunion, 3^e année (1932).
- (100) P. DAURE. — Introduction à l'étude de l'effet Raman, p. 17. *Editions de la Revue d'Optique* (1933).
- (101) W. W. COBLENTZ and R. STAIR. — Reflecting power of beryllium, chromium and several other metals. *Journal of Research, Bureau of Standards*, Vol. 2, p. 343 (1929).
- (102) M. LUCKIESH. — Spectral reflectances of common materials in the ultraviolet region. *Jour-*

nal of the Optical Society of America, Vol. 19,
p. 1 (1929).

- (103) R. W. WOOD. — On screens transparent only
to ultraviolet light and their use in spectrum
photography. *Philosophical Magazine*, Series 6,
Vol. 5, p. 257 (1903).

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	7
CHAPITRE PREMIER. — <i>Etude de la fluorescence des sé-</i> <i>rums</i>	
1. Travaux antérieurs au sujet de la fluorescence des sérums	13
2. Importance de la spectrophotométrie dans l'étude de la fluorescence des sérums	14
3. Objet de mes recherches	17
CHAPITRE II. — <i>Méthodes spectrophotométriques dans</i> <i>l'étude du rayonnement des sources lumineuses de</i> <i>faible intensité</i>	
1. Sources étalons d'énergie	24
2. Spectrophotométrie photographique	25
3. Spectrophotométrie visuelle	27
CHAPITRE III. — <i>Méthode expérimentale</i>	
1. Montage du spectrophotomètre adopté	32
2. Etalonnages	37
1° Etalonnage du spectromètre	37
2° Etalonnage du coin gris-neutre photomé- trique	39
3° Etalonnage des écrans absorbants complé- mentaires	42
3. Source de lumière de comparaison	46
1° Description de la source de comparaison	47
2° Répartition spectrale d'énergie de la source de comparaison	48

4. Source de radiation excitatrice	54
5. Cuve à liquides	59
6. Préparation de sérums	60
7. Manipulation	61
CHAPITRE IV. — <i>Résultats obtenus et discussion</i>	65
CONCLUSIONS	91
BIBLIOGRAPHIE	95
TABLE DES MATIÈRES	106

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Interférométrie. Application à la mesure
des longueurs d'onde

Vu et approuvé :

Paris, le 23 Novembre 1937.

LE DOYEN DE LA FACULTÉ DES SCIENCES,

CH. MAURAIN.

Vu et Permis d'imprimer :

LE RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE PARIS,

G. ROUSSY.

